

FROM THE DEPARTMENT OF SEROLOGY AND BACTERIOLOGY, UNIVERSITY  
OF HELSINKI

---

STUDIES ON THE OCCURRENCE  
OF VARIOUS LEPTOSPIRAL TYPES  
IN FINLAND

BY

*AIMO SALMINEN*

HELSINKI 1956

HELSINKI 1956  
MERCATORIN KIRJAPAINO



## PREFACE

I wish to express my deep gratitude to my highly respected and admired teacher, Professor K. O. Renkonen, M.D., Director of the Department of Serology and Bacteriology of the University of Helsinki. I have had the opportunity to carry out my work in the department led by him, and he has readily and regardless of trouble given me help. He has also shown continuous interest in my work and inspired me greatly at all its stages. He has placed the apparatus and equipment needed at my disposal and provided me with ideal working conditions. Indeed, it has been a pleasure to work under such circumstances.

I have been very fortunate to take the first steps in scientific work under the guidance of Mr. R. Koulumies, M.D. He introduced to me the idea of studying the problems of leptospirosis, which are among the most interesting in modern epidemiology. He has followed the progress of my studies with keen interest and has given me valuable advice and encouragement.

In the field of veterinary medicine, I have been in a pleasant and successful cooperation with Professor V. Rislakki, D.V.M., who has given me unfailing support during my study. I extend my sincere thanks to him for his help. I also wish to thank Mr. A. Andersson, D.V.M., who has kindly taken the samples of the canine sera in connexion with the autopsies.

The biologists, Mr. O. Kalela, Ph.D., Mr. L. Siivonen, Ph.D., and Mr. P. Voipio, Ph.D., have readily given me very valuable information on the species of micromammals and on their occurrence in Finland, for which I am deeply grateful to them. My particular thanks are due to Mr. Ilkka Virkkunen, who has captured a considerable part of the mice and performed the determination of species very skillfully.

I have the pleasure to thank Mr. E. Klemola, M.D., Mr. A. Oksala, M.D., and Mr. I. Ruikka, M.D., as well as many other colleagues with-

out mentioning the names for their kindness in sending me the leptospiral samples from patients under their treatment.

Professor J. W. Wolff, M.D., Amsterdam, has read the manuscript and made many invaluable suggestions. I am especially grateful to him for his constructive criticism. Professors J. W. Wolff and C. Borg-Petersen, M.D., Copenhagen, have kindly placed all the leptospiral type strains needed at my disposal from their collections.

I wish to thank Miss Hilikka Ahokanta, Mag.Phil., who has translated my paper into English and helped me in ordering microfilms of the literature not available in Finland.

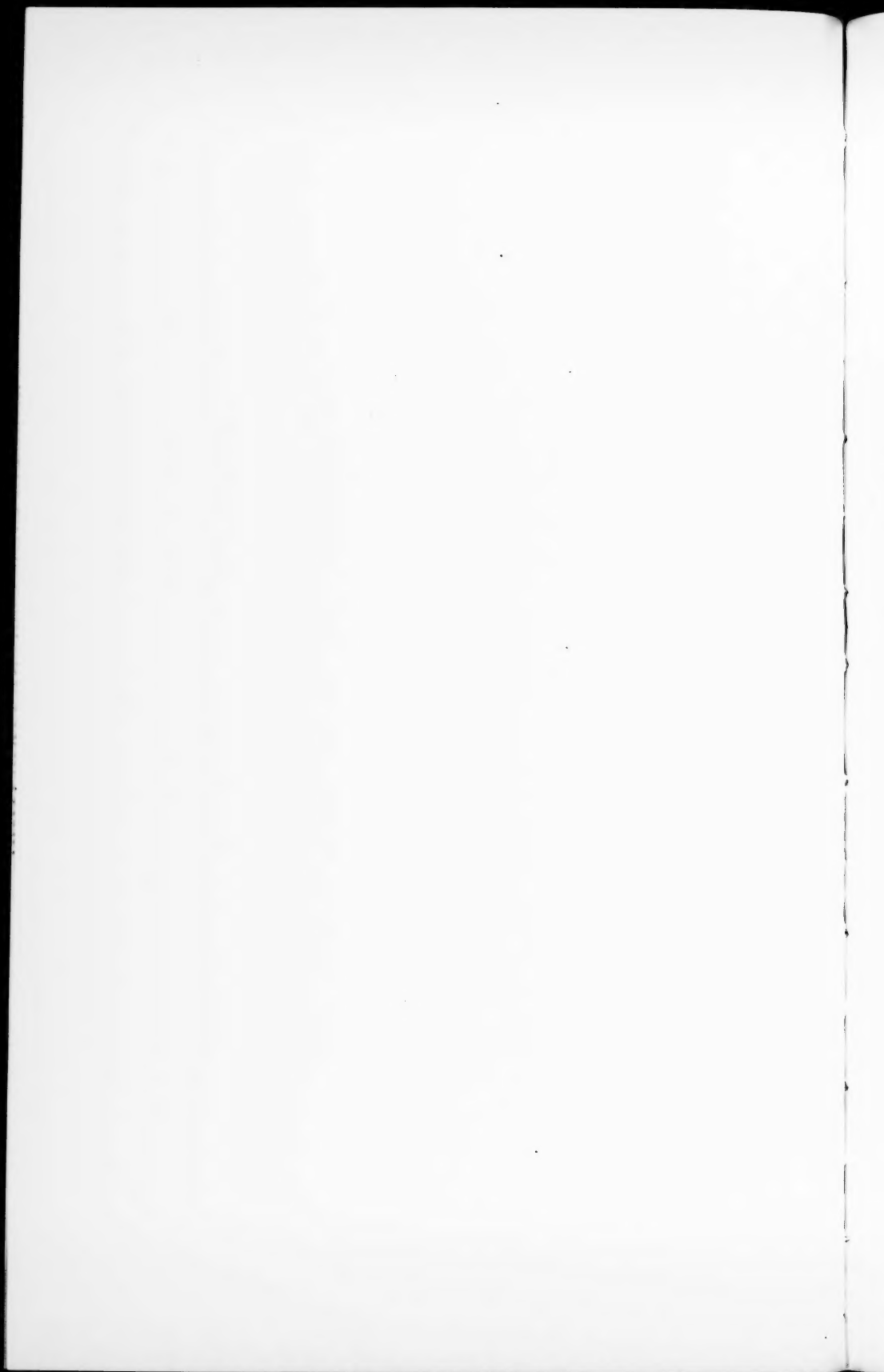
This study has been supported by grants from the »Sigrid Jusélius Stiftelse» Foundation, the Finnish Medical Society »Duodecim», and the University of Helsinki.

Helsinki, December 1955

*Aimo Salminen*

# CONTENTS

	Page
PREFACE .....	3
CONTENTS .....	5
INTRODUCTION	
Short History of Leptospirosis .....	7
Laboratory Procedures .....	10
Earlier Investigations in Finland .....	13
SUBJECT OF THE STUDY .....	14
METHODS AND TECHNIQUE	
Cultivation .....	15
Type Strains and Immune Sera .....	17
Agglutination Lysis Test .....	18
Absorption Test .....	19
Histological Examinations .....	19
Part I. INVESTIGATIONS ON LEPTOSPIROSIS IN SMALL RODENTS AND SHREWS	
Survey of the Literature .....	20
Occurrence of Small Rodents and Shrews in Finland .....	24
Series and Results .....	27
Identification of the Isolated Strains .....	32
Conclusions .....	38
Part II. INVESTIGATIONS ON LEPTOSPIROSIS IN DOMESTIC ANIMALS	
Survey of the Literature .....	39
Series and Results .....	43
Conclusions .....	48
Part III. INVESTIGATIONS ON HUMAN LEPTOSPIROSIS	
Survey of the Literature .....	49
Series and Results .....	51
Conclusions .....	61
DISCUSSION .....	62
SUMMARY .....	67
LITERATURE	
Monographs on Leptospirae and Leptospirosis .....	70
Other References .....	70



## INTRODUCTION

### SHORT HISTORY OF LEPTOSPIROSIS

The first form of leptospirosis was identified as a clinical entity after Weil (245), in 1886, reported on four cases of acute febrile illness with symptoms of icterus, nephritis, and splenomegalia. It is true that some research workers (246, 233) had even previously paid attention to these clinical features, but it was not until Weil's study aroused interest that similar cases were identified as Weil's disease in various parts of the world. The clinical picture was severe, often fatal febrile illness with typical symptoms of icterus, renal lesions, uremia, hypotonia, hemorrhages, hyperemia of the sclera, muscular pains, and often meningitis.

In 1894, Müller (149) gave a very detailed description on a large mud or field fever epidemic in Germany. It was noted that the disease had a great resemblance to Weil's disease; the symptoms were, however, much milder icterus being almost always absent and the prognosis proved to be favorable generally.

The etiology of Weil's disease was resolved in 1914—15 when the causative organism was discovered by Inada, Ido *et al.* (99, 100) in Japan and called by them *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*. Similar findings were made independently in Germany by Hübener, Reiter (95, 96), and Uhlenhuth, Fromme (231, 232). After injecting blood taken from a patient during the first week of Weil's disease, or later the urine, into the guinea pig the animal developed a fatal icteric and hemorrhagic illness, whose causative microbe was found to be a spirocheta, named *Leptospira* by Noguchi (159).

Since the discovery of Weil's disease, only sporadic outbreaks of the illness occurred and the disease was not communicable among human beings. The first hint to the epidemiology came from Japanese Miyajima in 1916, when examining microscopically the kidneys of mice he found leptospirae there by chance. The systematical studies on rats in Japan showed that *Rattus norvegicus* carried

guinea pig-pathogenic leptospirae in the kidneys in about 40 per cent (97). This finding was soon confirmed in various parts of the world and the rats proved to be infected with leptospirae to a varying extent everywhere. It was thus evident that Weil's disease is primarily an infection of rats which carry the causative organisms in their kidneys wherefrom the infection is passed with the urine outside the body.

In 1917, soon after the discovery of the leptospira of rats, *L. icterohaemorrhagiae*, another leptospiral type, *L. hebdomadis*, was found in Japan. In man it produced a milder non-icteric febrile illness, and its carrier was a mouse, *Microtus montebelli* (98). Serologically this type differed entirely from *L. icterohaemorrhagiae* and was not pathogenic for the guinea pig. In the following years, mainly Dutch scientists isolated several new leptospiral types in Indonesia, namely *L. autumnalis* (21) and *L. pyrogenes* (238) in 1923 in Sumatra, *L. bataviae* (240) in 1926 and *L. javanica* (192, 64) in 1937 in Java, and *L. andaman* A (222) in 1931 in the Andaman Islands. Between the years 1936—1942 the Australian research group discovered four new types, viz., *L. pomona* (52), *L. australis* A and *L. austrialis* B (134), and *L. hyos* (102).\*

In Central Europe the results obtained from the studies on field fever were first obscure and the main attention was paid to the classical Weil's disease. It was not until 1928 that the problem was solved by Tarasov (224, 223) who was able to cultivate a new leptospiral type, *L. grippityphosa*, from an epidemic occurring near Moscow. The antibody examination of the sera from field fever patients in Germany showed this type to be the causative organism of field fever. Tarasov thought that *L. grippityphosa* lived and developed primarily in water, as he often noted leptospirae in moist soil and waters; these were, however, probably of nonpathogenic type, *L. biflexa*. More than ten years later Schüffner (206) in the Netherlands showed the carrier of *L. grippityphosa* to be the common vole, *Microtus arvalis*. Accordingly, also this form of leptospirosis had a carrier host among small rodents.

\* The original name of this type, *L. mitis*, given by Johnson (102) is a homonym. Previous to Johnson, Mino (140) named a leptospiral type he isolated in Italy, *L. mitis*, which later proved to be identical with *L. bataviae* (78). At a meeting of the International Judicial Commission of the International Committee on Bacteriological Nomenclature in Rome, Aug. 1953, the designation «hyos» according to Savino and Renella (196) was officially accepted as the oldest legitimate epithet for Johnson's strain.

In Denmark, Borg-Petersen (34, 39) cultivated a new leptospiral type, *L. sejroe*, belonging to the hebdomadis serogroup from the blood of a fever patient. *L. sejroe*, whose carrier is the house mouse, *Mus musculus*, is the main causative organism of mild leptospirosis not infrequent in Denmark (37). In addition, Borg-Petersen (35, 36) succeeded in cultivating two other new leptospiral types from mice, *L. saxkoebing* and *L. ballum*.

Since 1937, Mino (140, 141, 142, 143, 144) and Babudieri (19, 13, 14, 17) studied leptospirosis in the rice fields of Northern Italy. They found several infections with many leptospiral types isolated previously in Asia, e.g., *L. bataviae*, *L. australis* B, *L. pomona*, and *L. hyos*, and with other types such as *L. icterohaemorrhagiae*, *L. sejroe-saxkoebing*, and *L. grippolyphosa*. The most common type in the rice field leptospirosis was *L. bataviae*. According to Mino (143), its carrier is the harvest mouse, *Micromys minutus*, in Italy, while in Indonesia the main carrier of *L. bataviae* is obviously *Rattus norvegicus* (193, 147, 62). Mino (143, 144) isolated further a new leptospiral type, *L. poi*, from man, which later was found to belong to the javanica serogroup (7).

As early as the end of the nineteenth century, a severe often fatal illness in dogs called »Stuttgarter Hundeseuche» was described, whose manifestations involved hemorrhagic enteritis or chronic nephritis (119). A part of the cases were found to be caused by *L. icterohaemorrhagiae*. In 1932, Klarenbeek and Schüffner (118) succeeded in cultivating another type, *L. canicola*, from dogs. With regard to *L. canicola*, no carriers have been found among the rodents. Its clinical picture in dogs is milder than that caused by *L. icterohaemorrhagiae*. After the acute phase, infections with both types result in leptospiuria of a few weeks' or months' duration when the disease may be transmitted to man.

Similar endemic leptospirosis without any carrier in small rodents has been found among swine with types *L. pomona* and *L. hyos*. Gsell (83, 84, 87) and Wiesmann (87) recorded in 1944—48 that a so-called swineherd's disease, which is rather common in Switzerland and was for a long time considered a viral infection, was leptospirosis caused by *L. pomona* and *L. hyos*, the infection coming from swine. The endemic form of leptospirosis produced by *L. vitulina* in the USSR (209) and *L. bovis* in Israel (24) also occur among the cattle. These leptospiral types are closely related to

*L. grippolyphosa* (254) and are possibly identical with each other.

Leptospirosis has thus proved to be a much more common and complicated illness than the original Weil's disease. Leptospirae are of considerable significance as causative organisms of diseases occurring both in man and in domestic animals.

#### LABORATORY PROCEDURES

In bright-light microscopy the leptospirae are practically invisible and when phase contrast microscopy is applied they can be distinguished slightly better, the dark-field illumination being the best aid in leptospiral investigations. Usually a small magnification of 1 : 200 without a cover glass is sufficient, and an immersion oil objective is needed for morphological studies only. It is easy to distinguish the leptospirae from other spirochetes on the basis of form and movements, but different leptospiral types are morphologically identical and can be separated only serologically. Leptospirae stain poorly with usual bacterial stains, Giemsa-solution (7) and Vago's staining method (234, 235) perhaps yield the best results. In tissue specimens the leptospirae can be detected by means of the silver impregnation method, *e.g.*, according to Fielding's technique (68).

For cultivation of leptospirae several culture media have been reported, Vervoor's medium (237, 238) modified by Wolff (250) and Korthof's (126, 127) medium being those most commonly used. In general, leptospiral culture media are composed of 10 per cent rabbit serum, phosphate buffer, and often peptone. In addition to the liquid media, Dinger's modification (58) from Noguchi's semi-solid medium (160) containing agar has been used, as leptospirae remain alive longer in it than in liquid media. Hemoglobin solution and yeast extract have shown a slight growth promoting influence (38, 2). So far it has not been possible to cultivate leptospirae in synthetic media, though numerous attempts have been made (244, 187, 81, 82, 202).

Animal experiments can also be employed for the demonstration of leptospirae, although their use is limited by the lack of an experimental animal, for which all leptospiral types in common are pathogenic. *L. icterohaemorrhagiae* causes a fatal illness in young guinea



pigs (150—175 g), and *L. icterohaemorrhagiae* and *L. canicola* in Syrian golden hamsters (131, 178), while the other leptospiral types produce only a transient febrile reaction in these animals. It is possible to cultivate the leptospiral strain from the peritoneal exudate or blood on the 2nd—5th day after inoculation. It is the advantage of animal experiments that also infected material can be investigated, and the isolation of leptospirae from urine is most successful indeed when injecting the urine first into the guinea pig. Leptospirae are not generally virulent for white mice, but they become easily carriers excreting leptospirae in abundance with the urine, though this method may be unreliable because spontaneous leptospirosis has been described among laboratory mice.

The most common method for the demonstration of antibodies is the agglutination lysis test (250, 207, 182, 5, 248, 7). The reaction is performed by mixing equal amounts of serum dilutions and well-grown cultures of different leptospiral serotypes and by examining the samples microscopically after an incubation of a few hours' duration. Both the agglutination and lysis occur simultaneously in the sera containing antibodies. The complement is not necessary for the lysis in this instance, as it is with bacteria. Leptospirae killed by formalin can also be used as antigens (208, 203), and hereby only an agglutination is visible. It might be more advisable, however, to use living leptospirae in the agglutination lysis test, as the formalinized leptospirae give less sensitive reactions (242) and spontaneous agglutinations and nonspecific reactions may sometimes occur (260).

The complement fixation test has also been used with success. Leptospiral cultures as such were used as antigens by Noguchi (161) and Bessemans and Nélis (26). Gaehtgens (73, 74, 75) prepared an antigen from leptospirae by centrifuging them from the culture and suspending the leptospirae in saline that contained 0.3 per cent carbolic acid. Many workers have published results obtained by Gaehtgens's method (177, 170, 71, 31) and Behringwerke has prepared this antigen for commercial use. In the United States, leptospiral complement fixation tests have been performed in recent years according to the method of Randall, Wetmore, and Warner (179) with sonic vibrated antigens prepared from formalinized leptospirae. Ezell and co-workers (65) found a soluble specific antigen in leptospiral cultural liquid which obviously develops when the leptospirae dissolve into the culture fluid (173). Carlinfanti (47, 48)

reported an antigenic property common to all leptospiral types in alcoholic extracts of leptospirae. Pike *et al.* (174) recommended to perform the leptospiral complement fixation tests on plates to save the antigen. The advantages of the complement reaction are the easy and distinct reading of the results and the preservation of antigen so that continuous and laborious cultivation of the type strains of leptospirae can be avoided.

Many workers have reported different modifications of macroscopically visible agglutination test by using concentrated formalinized leptospiral suspensions as antigens (176, 216, 77, 91). Macroscopical agglutination tests are less sensitive than the microscopic agglutination lysis reaction, though they can perhaps be used in diagnostics. Chang and McComb (50) found recently an erythrocyte sensitizing substance of polysaccharide nature, which causes the agglutination of erythrocytes in the presence of leptospiral antibodies.

In the serological identification of leptospiral strains the absorption tests of antibodies play an important role. The absorption tests can also be employed for determination of the infecting serotype, when various types yield equally high titer values in the antibody titration. After it was found that leptospiral cultures alone were not able to absorb antibodies sufficiently, formalinized culture concentrations came into use. The method was introduced by Ruys and Schüffner (190) and further developed by Schüffner and Bohlander (205) and Wolff (7).

In 1952, Wolff (251, 252, 7, 256) extending the antigenic analysis of various serologically different isolates, arranged and regrouped these leptospiral strains by tabulating the antigenic properties of various leptospiral types. He grouped 36 serotypes into 20 serogroups beginning from *L. icterohaemorrhagiae* according to antigenic relationships. Many strains published as new serotypes proved to be identical with the types previously known. The type collection available at Wolff's Institute has also been of great value. A comparison of the leptospiral types isolated in the USSR with the western strains would also be desirable, *e.g.*, *L. DV-A* 1938, *L. DV-V* 1938, *L. rostovskaja* 1939, *L. vitulina* 1939, *L. sorex* 1947, *L. erinaceus auritis* 1949, and *L. nero* 1950 (6, 3).

## EARLIER INVESTIGATIONS IN FINLAND

As early as 1878, Runeberg (189, 210) found cases of icteric fever in The Second Medical Clinic in Helsinki, which were not identical with any other disease known by then and which were diagnosed by him as *febris remittens cum ictero*. The identity of these cases with Weil's disease was discovered later. Since then, 30 cases of leptospirosis have been published in Finland, the diagnosis being based on the clinical picture (210, 132, 70). All of them have been icteric severe cases with typical symptoms and, no doubt, cases of Weil's disease.

Blomberg (27) published the first serologically verified infection with *L. icterohaemorrhagiae* in 1936, the antibody determination being performed in Stockholm. The serological diagnosis of leptospirosis has been in use in Finland since 1943. The samples have been examined in the agglutination lysis test with varying serotypes selected at random. Among the three cases published by Kalaja (106) in 1948 was the first identified leptospirosis of another type than *L. icterohaemorrhagiae*, viz., *L. grippityphosa*. Koulumies and Salminen (129) published the entire routine material of leptospiral samples investigated between the years 1943—52 and an additional series of 1,000 Widal samples studied for leptospiral antibodies. On the basis of serological examinations, 33 diagnosed leptospiroses were divided into the following serotypes: *L. icterohaemorrhagiae* 17, *L. andaman* A 5, *L. sejroe* 4, *L. grippityphosa* 2, *L. canicola* 1, and the serotype remained unclear in four cases. The first nine anicteric leptospiroses found in Finland were present in this material.

In the field of veterinary medicine, Stenius (218) established leptospirosis in silver foxes in 1939 using the histological technique, but because no serological or bacteriological investigations were performed, the infecting leptospiral serotypes were not ascertained. Recently, Rislakki and Salminen (186) examined rats as carriers of leptospirae in Finland. Some of the results of this investigation are summarized in the present study that also contains some unpublished data from the same material.

## SUBJECT OF THE STUDY

The purpose of the present study was to elucidate the leptospiral serotypes, their occurrence and sources of infection in Finland.

Since leptospirosis is a zoonosis, the causative organisms being primarily localized in small mammals and domestic animals from which the disease is transmitted to man, it was considered to be of importance to examine these disease reservoirs also in addition to man.

The study was divided into three parts:

1. An attempt was made to cultivate leptospirae systematically from the kidneys of small rodents, such as rats, mice, voles, and other possible leptospiral carriers. The isolated strains were identified serologically.

2. The leptospiral antibodies were investigated in the sera of domestic animals, namely of dogs, swine, cattle, and horses. This showed us whether endemic leptospiroses occur among domestic animals in Finland. Since domestic animals are easily infected with leptospirae from small mammals, this investigation will also throw light on the murine leptospiral types.

3. The blood samples of the patients suspected of leptospirosis were examined serologically with special attempt to determine the leptospiral type causing the infection in positive cases. At the same time it was possible to make observations on the agglutination lysis test as a diagnostic aid.

## METHODS AND TECHNIQUE

### CULTIVATION

As a culture medium Korthof's medium (126, 127) was used with an addition of 0.1 per cent of Difco's yeast extract and hemoglobin solution of the rabbit. The stock solution was prepared by dissolving the following amounts of pure chemicals into 2,000 g of distilled water:

Difco's yeast extract .....	2.0
Peptone »Witte« .....	1.6
NaCl .....	2.8
NaHCO <sub>3</sub> .....	0.04
KCl .....	0.08
CaCl <sub>2</sub> .....	0.08
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.36
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 2H <sub>2</sub> O .....	1.92

The solution was sterilized immediately in autoclave at + 110° C and was placed in a frigidaire overnight. On the following day it was filtered and pH was adjusted to 7.2—7.3. The original pH of the solution was rather constantly 7.0, so that 10 drops of 10 per cent NaOH had to be added. Sterilization was then performed in autoclave and a day after cooling another filtration and final sterilization were done. After that the stock medium was ready for use.

A group of rabbits in whose sera leptospirae grew well was reserved for leptospiral investigations. Sterile blood samples, 40—50 ml from each rabbit, were drawn through cardiac puncture once a month and the serum was separated for the medium. The hemoglobin solution was prepared by mixing one part of erythrocytes of the rabbit into four parts of distilled sterilized water. After the hemolysis the solution was centrifuged until it was clear. It was added to the serum of 1 : 10, which was thereafter inactivated on three successive days for 30 min. at + 56° C.

The culture medium was pipetted from the stock solution as sterilely as possible into test tubes, 5 ml to each. The tubes were stopped with cotton wool when used in laboratory, but with corks for transportation. The sterility was confirmed by boiling the tubes in steam at Koch's apparatus on two days for 45 min. each time. Inactivated serum containing hemoglobin solution was then added sterilely into the tubes, 0.5 ml to each. Sterility was confirmed by keeping the tubes in incubator at + 37° C for 24 hours. For absorption tests leptospirae were cultivated in bottles containing 100—200 ml of culture medium.

TABLE 1  
ORIGIN OF TYPE STRAINS AND

Serotype	Strain	Abbr.	Isolated in
1. <i>L.icterohaemorrhagiae</i> AB	Wijnberg	<i>Ict.</i> AB	The Netherlands 1933
2. <i>L.icterohaemorrhagiae</i> A	Kantorowicz	<i>Ict.</i> A	The Netherlands 1931
3. <i>L.javanica</i> .....	Veldrat Batavia —46	<i>Jav.</i>	Java 1937
4. <i>L.poi</i> .....	Poi	<i>Poi</i>	Italy 1942
5. <i>L.canicola</i> .....	Hond Utrecht IV	<i>Can.</i>	The Netherlands 1931
6. <i>L.ballum</i> .....	Mus 127	<i>Ball.</i>	Denmark 1943
7. <i>L.australis</i> A .....	Ballico	<i>Aus.</i> A	Australia 1936
8. <i>L.pomona</i> .....	Pomona	<i>Pom.</i>	Australia 1936
9. <i>L.grippolyphosa</i> .....	Moscow V	<i>Gri.</i>	The USSR 1928
10. <i>L.sejroe</i> .....	M 84	<i>Sej.</i>	Denmark 1937
11. <i>L.saxkoebing</i> .....	Mus 24	<i>Sax.</i>	Denmark 1942
12. <i>L.bataviae</i> .....	van Tienen	<i>Bat.</i>	Java 1932
13. <i>L.paidjan</i> .....	Paidjan	<i>Paid.</i>	Sumatra 1932
14. <i>L.andaman</i> A .....	CH-11	<i>And.</i>	The Andamans 1931
15. <i>L.hyos</i> .....	Mitis Johnson	<i>Hyos</i>	Australia 1940

Though no systematical comparisons were made, it seemed to me that leptospirae grew better and more safely in the medium with yeast extract and hemoglobin solution than in the original Korthof's medium.

The leptospiral strains were recultivated at intervals of one to six weeks, usually at three-week intervals, by transferring 0.5 ml of the culture into the sterile culture medium tube. The inoculated tubes were incubated at  $+ 30^{\circ}\text{C}$  for 1—2 weeks and were thereafter placed at room temperature ( $+ 20^{\circ}\text{C}$ ). The growth was controlled by cloudy turbidness which became visible in shaking the tubes in indirect light. In uncertain cases the cultures were examined microscopically.

The renal culture was made with a thin Pasteur pipette. The abdominal cavity was opened, the kidney was taken out and its surface was slightly burnt with hot forceps. At this site a thin Pasteur pipette was introduced into the cortex and the contents of the pipette were blown into a culture tube. The cultures were checked for leptospirae one, two, and four weeks after the inoculation.

Bacteria other than leptospirae grow abundantly in leptospiral culture media and may be the cause of a poor growth or even death of leptospirae. The contaminated cultures were cleaned from bacteria and fungi by using the living guinea pig filter reported by Schüffner (204). A few milliliters of contaminated culture were injected intraperitoneally into the guinea

TABLE 1  
STRAINS AND TITERS OF ANTISERA

	Author	Literature	Received from (Year)	Titer of Antiserum
1935	Schüffner	(34, 79)	Wolff (1953)	1: 6,400
1931	Schüffner	(34, 79)	Wolff (1953)	1: 12,800
1937	Sardito, Mochtar, Wirasmo	(192, 64)	Wolff (1953)	1: 6,400
1941	Mino	(143, 144)	Borg-Petersen (1953)	1: 3,200
1931	Klarenbeek, Schüffner	(118, 203)	Borg-Petersen (1952)	1: 6,400
1943	Borg-Petersen	(36, 255)	Borg-Petersen (1953)	1: 6,400
1936	Lumley	(134)	Wolff (1953)	1: 3,200
1936	Clayton, Derrick, Silento	(52)	Borg-Petersen (1952)	1: 25,600
1928	Tarasov	(224, 223)	Borg-Petersen (1952)	1: 3,200
1937	Borg-Petersen	(34, 39)	Borg-Petersen (1952)	1: 12,800
1942	Borg-Petersen	(35)	Borg-Petersen (1953)	1: 12,800
1932	Dinger	(240, 241, 59)	Borg-Petersen (1953)	1: 12,800
1932	?	(252, 145)	Wolff (1954)	1: 25,600
1931	Taylor, Goyle	(222)	Borg-Petersen (1953)	1: 12,800
1940	Johnson	(102, 196)	Borg-Petersen (1953)	1: 12,800

pig and after 15—30 min. leptospiral cultivation was made from blood samples obtained by cardiac puncture. In our experience, this was a good method leading easily to results.

#### TYPE STRAINS AND IMMUNE SERA

In serological investigations 15 type strains (Table 1) were used, including all serotypes occurring in Europe and some Asiatic types closely related to them. Professor C. Borg-Petersen, M.D., (The State Serum Institute, Copenhagen), and Professor J. W. Wolff, M.D., (The Royal Institute for Tropical Medicine, Amsterdam), kindly placed the type strains at my disposal.

An immune serum was prepared against each type by injecting well-grown leptospiral culture in amounts of 1 ml, 2 ml, 5 ml, 5 ml, 5 ml into the aural veins of the rabbit at intervals of five days and, if necessary, an extra dose of 5 ml. Ten days after the last injection, a blood sample was taken from the aural vein, and if the antibody titer proved to be  $\geq 1: 3,200$  in the preliminary test, the blood was collected by cardiac puncture. The immune sera were stored in deep freeze at  $-25^{\circ}\text{C}$ . Table 1 shows the origin of the type strains and the titers of the antisera.



## AGGLUTINATION LYSIS TEST

Leptospiral antibodies were determined by microscopical agglutination lysis test using living well-grown leptospiral cultures (more than 100 leptospirae in ocular field with magnification of 1 : 200). The following technique was employed.

The sera that were not inactivated were diluted with tap water in Kahn tubes. In order to know whether a serum contained leptospiral antibodies it was first examined in the dilution of 1 : 25 (titer 1 : 50) with different types. In positive cases the serum was further titrated in two-fold dilutions with positively reacting serotypes until the final titer. According to the general practice, the final dilution of the serum after adding the leptospirae was reported to be the titer which was, of course, twice as high as the original dilution of the serum.

The serum dilutions and leptospirae were mixed on an agglutination plate by expelling one drop of each into depressions of the plate. After two to four hours' incubation at + 30° C, the results were read in the following way. A drop of one of the dilutions was taken in a platinum loop and placed on a slide. It was examined with a slightly magnifying objective without the use of cover glasses in dark-field illumination (objective 20 ×, aperture 0.45, ocular 10 ×, Zeiss Kardioidkondensor with immersion oil between the condensor and slide). The following criteria were used in evaluating the positiveness of the agglutination lysis test:

- +++ Practically all leptospirae were agglutinated or lysed.
- ++ Ca. two-thirds of leptospirae were agglutinated or lysed.
- + Ca. one-third of leptospirae was agglutinated or lysed.
- ± Less than one-third was agglutinated or lysed, though there appeared clear agglutination or lysis as compared with the control sample.

Leptospiral conglomerations, occurring occasionally outside the titer limit and composed of living, movable, and uninjured leptospirae, were not considered positive. These conglomerations have been called by various workers «Brutnester», «foyers de multiplication», and «agglutinats stellaires».

*The Specificity of the Agglutination Lysis Test.* — The following non-specific reactions which are not due to leptospiral antibodies have been ascertained:

1. Spontaneous agglutination may occur in some strains and is probably caused by an unsuitable rabbit serum in the culture medium. These culture tubes cannot be used in the agglutination lysis test. The spontaneous agglutination disappears when the strain is cultivated often in other culture tubes.
2. It has been found that some strains give occasionally positive reactions at low serum dilutions until ca. 1 : 100 regularly with all sera (44, 7). This phenomenon appeared many times also in the present study with the



serotypes *L. andaman* and *L. poi*. In sub-cultures the phenomenon, which is associated with the poor growth of the strain, will disappear.

It has also been found that the increasing density and age of the leptospiral culture used as antigen has a lowering influence upon the titer in the agglutination lysis test with living leptospirae (38). In the present study, only well-grown and fresh leptospiral cultures (aged 1—2 weeks) were used.

After the elimination of these »technical errors», the leptospiral agglutination lysis test is considered specific for leptospiral antibodies. The positive titer indicates acute or previously passed leptospirosis, because leptospiral antibodies may remain in the blood for years (2).

#### ABSORPTION TEST

The absorption tests were performed according to the method described by Wolff (7), except that different dilutions were used in titrations. The culture concentrate was prepared by adding 0.5 per cent formalin to 100 ml of well-grown leptospiral culture of about 7 days of age. The suspension was centrifuged for 30 min. at 15,000 r.p.m. (Spinco centrifuge). The fluid was carefully pipetted off so that the sediment was concentrated 50—100 times, which usually needed two centrifugations.

The serum to be absorbed was diluted until a titer of 1 : 3,200 or it was used undiluted, if the titer of unabsorbed serum was lower. The unabsorbed titer value must not, however, be less than 1 : 400. The amount of 0.1 ml of serum was added to 0.9 ml of culture concentrate and the mixture was left for the minimum of 24 hours at room temperature. Thereafter it was centrifuged for 10 min. at 10,000 r.p.m. and the supernatant fluid was used for the agglutination lysis test with formalinized leptospirae in the following dilutions:

The dilution of the absorbed fluid	$\frac{1}{2.5}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{640}$
The real dilution .....	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$
Percentage from the homologous titer .....	1.5	3	6	12.5	25	50	100	200	400

#### HISTOLOGICAL EXAMINATION

The sections of the kidneys of mice that could not be cultivated due to technical difficulties were examined histologically according to Levaditi's silver impregnation method for determining the leptospirae (68). Ten per cent formalin was used as fixation solution.

## PART I

### INVESTIGATIONS ON LEPTOSPIROSIS IN SMALL RODENTS AND SHREWS

#### SURVEY OF THE LITERATURE

Numerous investigations have been performed on the Norway rat, *Rattus norvegicus*, as a carrier of leptospirosis in various parts of the world. These studies, for more detailed description of which several monographs can be consulted (233, 28, 5, 2), have shown that the Norway rat is the main carrier of *L. icterohaemorrhagiae*, the rate of infection ranging from 20 to 60 per cent of the population in different areas. The percentage also varied due to different methods of examination. In the present survey main attention was paid to the investigations published in 1941 in the Northern countries. All rats tested belonged to the species of *Rattus norvegicus*.

*Sweden.* — Malmgren (135) investigated 583 rats, of which 37 per cent were positive according to the microscopical examination of the urine and renal suspensions, kidney cultivation and antibody determination. He isolated 79 leptospiral strains and all of them reacted up to the titer limit in the agglutination lysis test with a known *L. icterohaemorrhagiae* immune serum. The biotype was determined in 36 strains, 20 of them being *L. icterohaemorrhagiae* A and 16 *L. icterohaemorrhagiae* AB.

*Norway.* — Borgen and Thjøtta (33) performed investigations on 100 rats employing the following methods: the microscopy of renal suspensions (positive 29 per cent), cultivation (20 per cent), guinea pig test (30 per cent), and antibody determination against *L. icterohaemorrhagiae* (23 per cent). The rate of infection was 41 per cent in the entire series, being 57 per cent in the grown rats (60 individuals, the length 20 cm or more) and 18 per cent in the young rats.

*Denmark.* — Zuelzer (259) was the first to investigate rats in Denmark in 1936. She found by means of microscopical examination

that 23 of 93 rats in Copenhagen disseminated leptospirae in the urine. Ottosen (169) cultivated 127 strains (33.4 per cent) from 685 rats all of which proved to be *L. icterohaemorrhagiae* in serological examinations.

Besides *L. icterohaemorrhagiae*, other types of leptospirae have been isolated from *Rattus norvegicus*. In Djakarta, Java, the Norway rat is obviously the principal carrier of *L. bataviae*. Out of 431 rats tested there, 45 per cent were leptospiral carriers, and of 115 strains isolated from them 100 were of *L. bataviae*, the rest being of *L. javanica* type (193, 147). In Indonesia, the main carriers of *L. javanica* seem to be *Rattus rattus brevicaudatus* and other field rats. Out of 165 serologically identified strains isolated from them 164 belonged to *L. javanica* and only one to *L. bataviae* type (62).

Also in Europe, in the rice fields of Northern Italy, two strains of *L. bataviae* (236, 141) and one strain of *L. pomona* (19) have been isolated from the Norway rat. However, these may be occasional infections in rats, as the principal carrier of *L. bataviae* is there the harvest mouse, *Micromys minutus soricinus*, and that of *L. pomona* the swine. It must be borne in mind that types also from other animals may infect the rat as well as man and domestic animals.

Some species of mice and voles have proved to be of greater epidemiological significance than rats as carriers of leptospirae. The clinical picture of the diseases transmitted from mice and voles is milder than that of leptospirosis caused by *L. icterohaemorrhagiae*, but the occurrence of the former diseases is much more common in most geographical areas.

The first infections with *L. grippotyphosa* in the Netherlands occurred in a few school boys who used to capture common voles. This observation gave an impetus to examine *Microtus arvalis* as a source of infection of the field fever. In 1941, Schüffner succeeded in cultivating strains of *L. grippotyphosa* from the kidneys of *Microtus arvalis*. The systematical investigations of Schüffner and Bohlander (206) showed later that 27 of 56 common voles were infected with this type in the Netherlands.

Various investigations were now carried on in Central Europe, since field fever had previously been considered a primary soil infection without a rodent host. Rimpau (183, 184), Kathe (110), and Uhlenhuth (230) found *Microtus arvalis* to be the carrier of

*L. grippolyphosa*, though great variations of infection rate occurred in different places (0—80 per cent, the mean being 10—20 per cent). Popp (175) later discovered severe renal lesions in infected voles and came to the conclusion that leptospirosis of the common vole has a character of a true disease.

The source of infection of *L. sejroe* was solved by Borg-Petersen (39) in 1939, when he succeeded in cultivating five strains of *L. sejroe* from the kidneys of 22 house mice, *Mus musculus*.\* The results obtained by Borg-Petersen from the examinations of small rodents in Denmark were as follows, in total (37):

164 <i>Mus musculus</i>	18 isolated strains	16 <i>Sej.</i> , 1 <i>Sax.</i> , 1 <i>Ball.</i>
8 <i>Apodemus flavicollis</i>	2 » »	Both <i>Sax.</i>
123 <i>Microtus arvalis</i>	29 » »	All <i>Gri.</i>
32 <i>Microtus agrestis</i>	—	—
327 rodents	49 isolated strains	

Malmgren (135), however, did not find a single leptospiral strain in the kidneys of the 60 *Mus musculus* tested in Sweden. On the other hand, 15 strains of *L. ballum* were cultivated from 37 *Mus musculus* in Virginia, U.S.A. (257).

The studies performed by Mino (140, 141, 143, 144) in the rice fields of Northern Italy revealed that the harvest mouse, *Micromys minutus soricinus*, was the carrier of *L. bataviae* in Italy, that of *L. saxkoebing* being probably *Apodemus sylvaticus*. The detailed results obtained by Mino are summarized in the following:

108 <i>Rattus norvegicus</i>	15 isolated strains	All <i>Ict.</i>
32 <i>Rattus rattus</i>	— » »	—
110 <i>Apodemus sylvaticus</i>	12 » »	8 <i>Sax.</i> , 2 <i>Bat.</i> , 2 not tested
279 <i>Micromys minutus</i>	69 » »	61 <i>Bat.</i> , 8 not tested
21 <i>Arvicola italicus</i>	1 » »	Not tested
550 rodents	97 isolated strains	

\* It is obvious that the house mice investigated by Borg-Petersen belonged to the sub-species *Mus musculus musculus*, not to *Mus musculus spicilegus* as he himself informed, because the latter does not occur in Denmark. The nomenclature of the house mouse has indeed been very confusing in previous years. According to Mohr (148), three *Musculus* sub-species occur in Europe. *Mus musculus musculus* lives in Northern and Eastern Europe and *Mus musculus domesticus* in Western Europe. The river Elbe is an approximate border line between these species. *Mus musculus spicilegus* is a south-eastern sub-species living in the Ukraine and Hungary. The eastern Alps and the southern hills of the Carpathians form its northern border line.

In the USSR, Varfolomeyeva and Nikiforova (6) isolated a new leptospiral type, *L. sorex*, from the kidneys of the common shrew in 1947. This type was serologically related to *L. icterohaemorrhagiae*, being not, however, identical with it or with other serotypes known in Russia. Ananyin and Karaseva (10) cultivated *L. sorex* strains also from *Microtus oeconomus*, which is probably the principal carrier of *L. grippotyphosa* in the USSR. Another possibly new type has recently been isolated there; in 1949 Ananyin (9) cultivated 19 identical strains from the kidneys of the hedgehog, *Erinaceus auritis*, and called them *L. erinaceus auritis*.

Since 1949, Kmety has performed extensive epidemiological investigations in Czechoslovakia. He isolated leptospiral strains belonging to the serogroup *L. australis* A from the hedgehog (120, 122) and from *Apodemus flavicollis* (122), and strains of *L. pomona* from *Apodemus agrarius* (124). In addition, Kmety isolated a leptospiral type, *L. sorex* Jalna (121, 122, 123), related to *L. icterohaemorrhagiae*, from the common shrew. He cultivated the following strains from over 2,500 small mammals tested:

<i>Rattus norvegicus</i>	19 Ict.
<i>Mus musculus</i>	1 Sej.
<i>Apodemus flavicollis</i>	1 Sax., 3 Aus.A
<i>Apodemus sylvaticus</i>	1 Sej.
<i>Apodemus agrarius</i>	5 Pom.
<i>Apodemus microps</i>	1 Bat.
<i>Microtus arvalis</i>	19 Gri.
<i>Sorex araneus</i>	3 <i>L. sorex</i> Jalna
<i>Erinaceus roumanicus</i>	3 Aus. A

---

Total 56 isolated strains

Leptospirae have also been isolated from *Cynopterus* bats in Indonesia. In Java, Collier and Esseveld (54) cultivated a new serotype, *L. schüffneri*, from the brains of a bat through a guinea pig passage. Collier and Mochtar (55) investigated 700 *Cynopterus* bats and were successful in cultivating from their kidneys two leptospiral strains that differed serologically from *L. schüffneri* and were called *L. cynopteri*.

TABLE 2

MAIN MURINE CARRIERS OF DIFFERENT LEPTOSPIRAL TYPES

Species of Rodent	Leptospiral Type	Geographical Areas
<i>Rattus norvegicus</i>	<i>L.icterohaemorrhagiae</i> <i>L.bataviae</i>	All over the world Djakarta, Java
<i>Rattus r. brevicaudatus</i> and other field rats	<i>L.javanica</i>	Indonesia
<i>Mus musculus musculus</i>	<i>L.sejroe</i> <i>L.ballum</i>	Denmark Denmark; Virginia, U.S.A.
<i>Microtus arvalis</i>	<i>L.grippotyphosa</i>	Central Europe
<i>Microtus montebelli</i>	<i>L.hebdomadis</i>	Japan
<i>Micromys minutus</i>	<i>L.bataviae</i>	Italy

Table 2 summarizes the relatively certain main murine carriers of different leptospiral types. Besides these, a number of serotypes have been isolated from other species of small mammals, but the results are not sufficient for drawing conclusions with regard to the carrier state.

## OCCURRENCE OF SMALL RODENTS AND SHREWS IN FINLAND

## Rats

*Rattus norvegicus*, the Norway rat (in Finnish rotti), did not arrive in our country until the beginning of the nineteenth century. It displaced rapidly the until then exclusively existing house rat, *Rattus rattus*, which nearly died out around 1910 (116). The Norway rat infests houses, cattle sheds, warehouses, and dumping grounds increasing in numbers rapidly and causing great economical damages. It is exterminated in living centers at certain intervals.

*Rattus rattus*, the house rat (in Finnish musta rotti). Some individuals have been found recently in the warehouses of the harbors in Helsinki, where they have likely arrived in ships. They have not been met in other parts of the country (239).

## Mice

*Mus musculus*, the house mouse (in Finnish kotihiiri), accompanies man all over the country. It can be found in pantries, cellars, and sheds as well as in fields, barns, and dumping grounds.

*Apodemus flavicollis*, the yellow-necked field mouse (in Finnish metsähiiri), lives in woods, gardens, and barns and comes occasionally even to the living quarters in the winter.

*Micromys minutus*, the harvest mouse (in Finnish vaivaishiiri), lives in the fields of Southern and Central Finland. In the winter time harvest mice can be found in great numbers in sheds and barns where the grain and hay are stored. The occurrence of this species, especially, varies greatly in different years; sometimes their number increases very abundantly, sometimes they disappear almost totally.

## Voles

*Clethrionomys glareolus*, the common redbacked vole (in Finnish metsämyyrä), is the most common of our small rodents living in woods. In addition to this species, *Clethrionomys rufocanus*, the large-tooth redbacked vole (in Finnish harmaakuvemyyrä), is very common in Lapland. *Clethrionomys rutilus*, the northern redbacked vole (in Finnish punamyyrä), occurs in Northern Lapland as a rare species.

*Microtus arvalis*, the common vole (in Finnish kenttämyyrä), is a new species in Finland. Previously it was found infrequently only in the Karelian Isthmus (128), but after 1945 it moved rapidly towards Southern and Central Finland where it occurred even in masses in the years 1949—50 (212). The common vole lives in fields, sheds, and outbuildings.

*Microtus agrestis*, the field vole (in Finnish peltomyyrä), is common in the whole country living in fields, wooded meadows, and marshlands.

*Microtus ratticeps*, the root vole (in Finnish lapinmyyrä), is a northern species that can be found in meadows and marshlands only in Lapland.

*Arvicola terrestris*, the water vole (in Finnish vesimyyrä), lives in damp places by lakes, rivers, ditches, and watergrounds as well as in fields and gardens causing much harm.

## Lemmings

*Myopus schisticolor*, the wood lemming (in Finnish metsäsopuli), is a rare species occurring sporadically. Only a few individuals have been met in Eastern and Northern Finland in recent decades.

*Lemmus lemmus*, the Norway lemming (in Finnish tunturisopuli), lives in Lapland in the mountain zone and in the upper parts of the forest zone, the number of the population varying fluctually in periods of 3—4 years. From time to time, the lemmings increase in an unusual scale and start to move in great numbers. The last migrations occurred in years 1938, 1942, 1946, and 1955 (60, 211, 107, 108, 213).



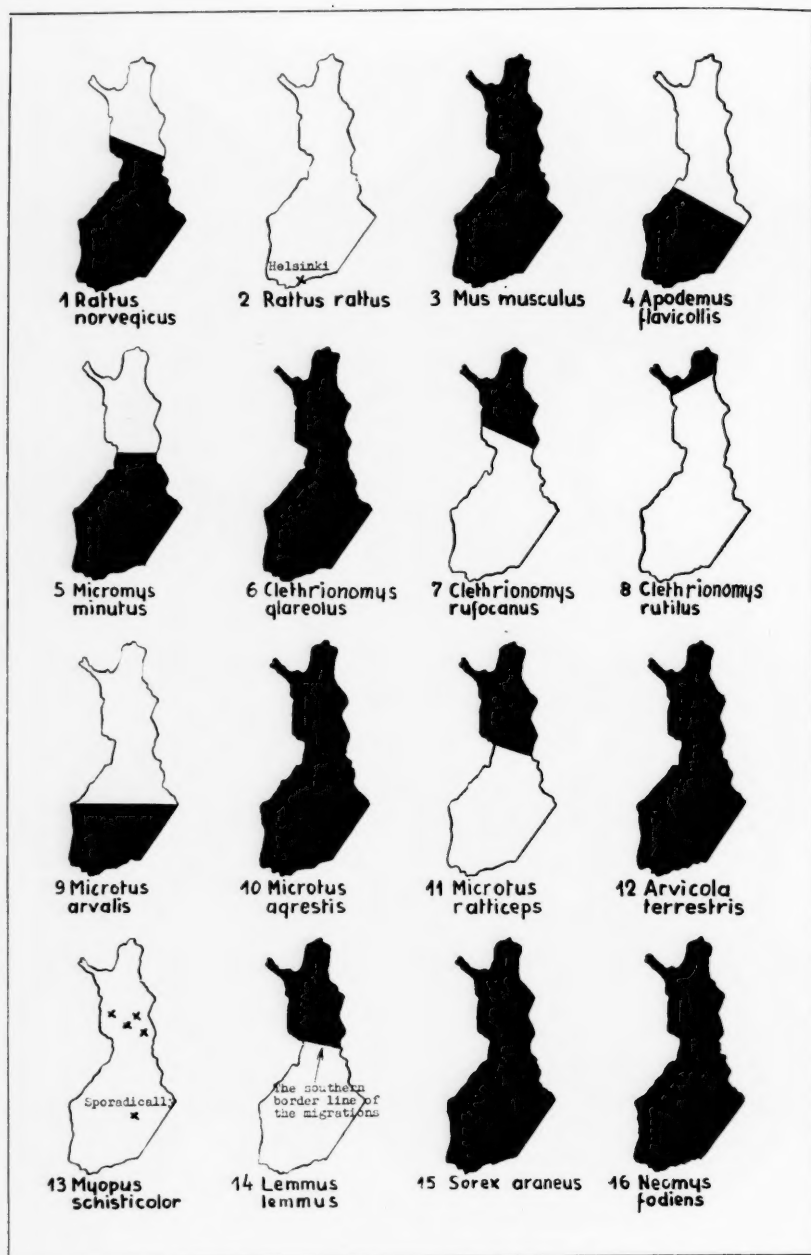


Fig. 1. — Areas of Distribution of Small Rodents and Shrews in Finland. (According to L. Siivonen, Ph.D.)



## Shrews

*Sorex araneus*, the common shrew (in Finnish tavallinen päästäinen), is very common in woods and fields all over the country. Of the other species, *Sorex macropygmaeus*, the Laxmann's shrew (in Finnish idän päästäinen), occurs at least in Eastern and Northern Finland and *Sorex minutus*, the lesser shrew (in Finnish vaivaispäästäinen), in the whole country (214). The latter is, however, much more infrequent than *Sorex araneus*.

*Neomys fodiens*, the European water shrew (in Finnish vesipäästäinen), occurs in watery places in the whole country.

In addition to the animals mentioned above, the following small rodents, which are not included the present study, occur in Finland: *Apodemus agrarius* (in Finnish peltohiiri) and *Eliomys quercinus* (in Finnish tammihiiri), as rare species in South-Western Finland, *Sicista betuliana* (in Finnish koivuhiiri) in Southern and Central Finland, and *Ondatra zibethica* (in Finnish piisamimyrä), introduced from North-America and now common all over the country.

Periodical fluctuations in the numbers of the population are typical of all these animals at intervals of 3—4 years. The fluctuation phenomenon is most regular among the small mammals in Lapland. In Southern Finland it is more irregular and the differences between the maximum and minimum are smaller. Great fluctuations of the population and mass occurrences in Southern Finland are common especially to *Micromys minutus*, *Microtus arvalis*, and *Microtus agrestis*.

Fig. 1 shows the areas of distribution of the small mammals investigated in the present study.

## SERIES AND RESULTS

In the years 1953—54, 505 micromammals in total were investigated, the series including almost all species of small rodents and shrews occurring in Finland. The cultures were made from the kidneys of 410 animals by means of a Pasteur pipette into 2—4 culture tubes. The kidneys of the remaining 95 animals, all captured on the Pyhätunturi hill, were examined only histologically by silver impregnation method. The results are summarized in Table 3.

Sixty-two leptospiral strains were cultivated from the 103 rats tested. The author examined the Norway rats with Professor V. Rislakki, and the results were published in detail elsewhere (186). The whole series of rats investigated in Finland by Rislakki and Salminen

TABLE 3

RESULTS OF EXAMINATIONS ON SMALL MAMMALS

Species of Animal	Number of Inves- tigated			Posi- tive	Pos. %	Figures of Isolated Strains
	Total	Southern Finland	Northern Finland			
1. <i>Rattus norvegicus</i> *....	100	100	—	62	62.0	R8, 9, 11, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 25, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 41, 42, 43, 49, 50, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 80, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 94, 96
2. <i>Rattus rattus</i> .....	3	3	—	—	—	— — — —
3. <i>Mus musculus</i> .....	26	24	2	6	23.1	M 34, 365, 366, 370, 381, 396
4. <i>Apodemus flavicollis</i> ..	8	8	—	1	12.5	M 316
5. <i>Micromys minutus</i> ....	44	44	—	4	9.1	M 339, 341, 350, 351
6. <i>Clethrionomys glareolus</i>	90	45	45	—	—	— — — —
7. <i>Clethrionomys rufocanus</i>	46	—	46	—	—	— — — —
8. <i>Clethrionomys rutilus</i> ..	2	—	2	—	—	— — — —
9. <i>Microtus arvalis</i> .....	33	33	—	4	12.1	M 156, 176, 178, 181
10. <i>Microtus agrestis</i> ....	28	25	3	3	10.7	M 154, 186, 187
11. <i>Microtus ratticeps</i> ....	17	—	17	—	—	— — — —
12. <i>Arvicola terrestris</i> ....	4	4	—	—	—	— — — —
13. <i>Myopus schisticolor</i> ..	3	—	3	—	—	— — — —
14. <i>Lemmus lemmus</i> ....	—	—	—	—	—	— — — —
15. <i>Sorex araneus</i> .....	83	40	43	1	1.2	M 1
16. <i>Sorex macropygmaeus</i>	3	—	3	—	—	— — — —
17. <i>Sorex minutus</i> .....	2	2	—	—	—	— — — —
18. <i>Neomys fodiens</i> .....	13	5	8	—	—	— — — —
Total	505	333	172	81	16.0	81 strains

\* Examined and published earlier by Rislakki and Salminen (186) «Part II» p. 123.

consisted of 248 rats. In this series the rate of infection was determined on the basis of the renal cultivation, guinea pig test, histological examination of the kidneys, and the determination of antibodies, and it ranged between 20 and 70 per cent at various places of capture (Table 4). The infections were most frequent in rats captured in the Zoological Gardens in Helsinki, where the rats occurred in abundance and where the extermination campaigns could not be performed effectively.

TABLE 4

PERCENTAGE OF LEPTOSPIRAL INFECTIONS IN *Rattus Norvegicus* IN DIFFERENT PLACES OF CAPTURE

(Published earlier by Rislakki and Salminen)

Place of Capture	Total	Positive	Positive %
Helsinki, houses in the city .....	67	14	20.9
» , Stable of State Veterinary Medical Institute .....	44	10	29.5
» , Zoolog. Gardens .....	107	76	71.0
Kauniainen, country .....	7	3	42.9
Turku, city .....	6	2	33.3
Lahti, city .....	17	3	17.7
Total	248	108	43.1

In total, 19 strains of leptospirae were cultivated from the kidneys of the following mice, voles, and shrews:

<i>Mus musculus</i> .....	6 strains
<i>Micromys minutus</i> .....	4 »
<i>Microtus arvalis</i> .....	4 »
<i>Microtus agrestis</i> .....	3 »
<i>Apodemus flavicollis</i> .....	1 strain
<i>Sorex araneus</i> .....	1 »
<hr/> 19 strains in total	

It was interesting to note that not a single leptospiral carrier was found among the 138 individuals belonging to the genus *Clethrionomys*.

TABLE 5  
DISTRIBUTION OF EXAMINED ANIMALS AND POSITIVE FINDINGS ACCORDING TO PLACES OF CAPTURE

Species of Animal	Southern Finland					Northern Finland				
	Helsinki and Surroundings	Loimaa	Ryttylä	Sysmä	Joroinen	Pyhä-tunturi	Olos-tunturi	Inari	Kilpis-järvi	Total Pos.
	Total Pos.	Total Pos.	Total Pos.	Total Pos.	Total Pos.	Total Pos.	Total Pos.	Total Pos.	Total Pos.	
1. <i>Rattus norvegicus</i> .....	100	62	—	—	—	—	—	—	—	—
2. <i>Rattus rattus</i> .....	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3. <i>Mus musculus</i> .....	5	1	3	—	4	—	—	2	—	—
4. <i>Apodemus flavicollis</i> .....	4	—	—	—	4	1	—	—	—	—
5. <i>Micromys minutus</i> .....	44	4	—	—	—	—	—	—	—	—
6. <i>Clethrionomys glareolus</i> .....	20	—	5	17	—	40	5	—	—	—
7. <i>Clethrionomys rufocanus</i> .....	—	—	—	—	—	10	—	15	21	—
8. <i>Glethrionomys rutilus</i> ..	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—
9. <i>Microtus arvalis</i> .....	21	4	12	—	—	—	—	—	—	—
10. <i>Microtus agrestis</i> .....	15	3	1	5	—	3	—	—	—	—
11. <i>Microtus rattiiceps</i> .....	—	—	—	—	—	7	—	4	6	—
12. <i>Arvicola terrestris</i> .....	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—
13. <i>Myopus schisticolor</i> .....	—	—	—	—	—	3	—	—	—	—
15. <i>Sorex araneus</i> .....	9	1	4	2	8	24	4	8	7	—
16. <i>Sorex macropygmaeus</i> ..	—	—	—	—	—	3	—	—	—	—
17. <i>Sorex minutus</i> .....	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—
18. <i>Neomys fodiens</i> .....	3	—	—	2	—	5	—	—	3	—
Total	230	75	36	5	25	26	1	16	9	38

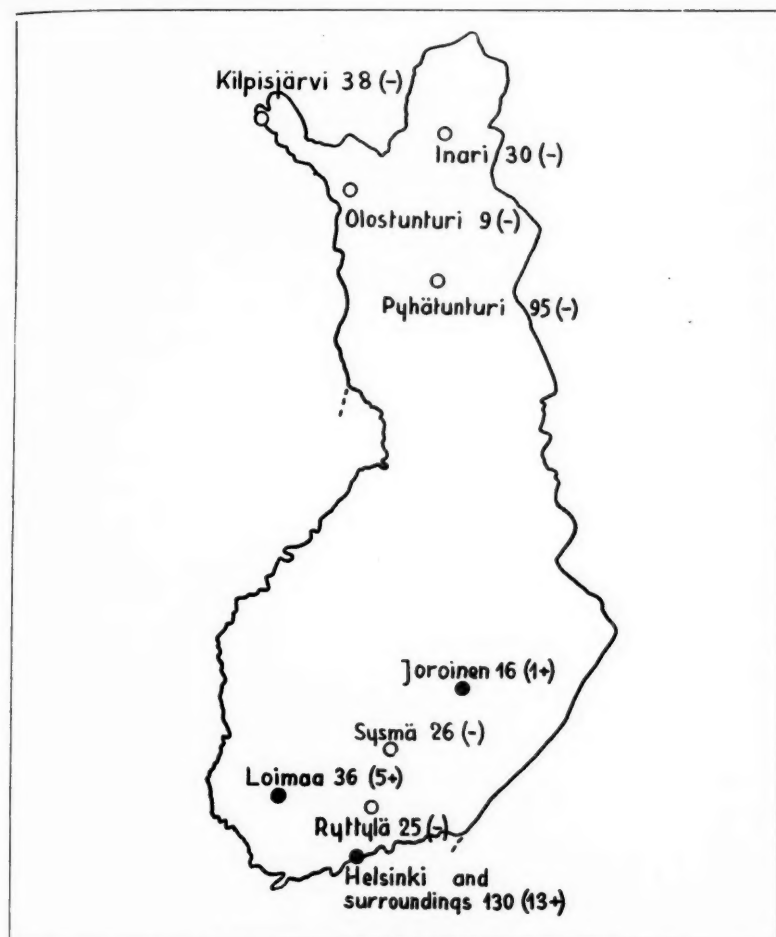


Fig. 2. — Places of Capture of Mice, Voles and Shrews.  
(In parentheses the number of isolated strains.)

The mice, voles and shrews were captured at nine various places in different parts of Finland, but leptospiral carriers were found in the following areas only (Table 5, Fig. 2):

Helsinki and surroundings .....	13 strains
Loimaa .....	5 »
Joroinen .....	1 strain
<hr/>	
19 strains in total	

No evidence of leptospiral infection was found among the 172 animals captured in Northern Finland. Considerable local variations

occurred in leptospiral infections of mice and voles; in certain areas some species were infected to a great extent while in other places not a single leptospiral strain could be cultivated from the same species. On the other hand, the rats were infected everywhere the rate of infection ranging within certain limits. In this respect the promoting factor was probably the increasing density of the rat population.

The cultivation was usually performed at the place of capture as soon as possible. In the entire series, 6 per cent of the culture tubes were contaminated with other bacteria, the rate of contamination varying considerably in different cases. Only 1 per cent of cultures from 100 rats captured alive were contaminated, the percentage of contamination being 3 per cent in 72 other animals captured alive and 6 per cent in 161 animals captured dead. The highest percentage of contamination, 15 per cent, occurred in the series of 77 animals investigated under rather poor circumstances in a tent in Lapland.

The cultures of the strain M 316 were contaminated with bacteria and the leptospirae were purified from bacteria by means of a guinea pig. An infected tube did not thus always mean that the culture was spoiled, as leptospirae can live and increase with certain bacteria.

In positive cases leptospirae almost always grew in all tubes. They generally became visible after one week's incubation. However, about one-tenth of the tubes became positive during the second week, but the number of positive cultures did not increase any more after a month.

#### IDENTIFICATION OF THE ISOLATED STRAINS

The 62 strains cultivated from the rats were first agglutinated with *L. icterohaemorrhagiae* AB immune serum using living leptospirae. The titer of the immune serum was 1 : 6,400 with *L. icl.* AB and 1 : 3,200 with *L. icl.* A. All the strains tested reacted with this immune serum in the titer ranges of 1 : 1,600—1 : 24,800. Though absorption tests could not be performed due to the great number of strains, it was obvious on the basis of the results obtained that all strains isolated from the rats belonged to the icterohaemorrhagiae serogroup, as none of our related leptospiral types showed reactions with the immune serum at so high dilutions. The results of the titration of the strains isolated from rats are shown in Table 6.

TABLE 6

TITRATION RESULTS OF STRAINS ISOLATED FROM RATS WITH TYPE IMMUNE SERA

Lepto- spiral Strains	Immune Serum <i>L.ict.</i> AB						Absorbed Serum <i>L.ict.</i> B				Bio- type
	1 800	1 1600	1 3200	1 6400	1 12800	1 25600	1 800	1 1600	1 3200	1 6400	
<i>L.ict.</i> AB	+++	++	+	+	—	—	+++	++	+	±	
<i>L.ict.</i> A	++	++	+	—	—	—	—	—	—	—	
<i>L.javanica</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>L.poi</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>L.canicola</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>L.ballum</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
R 8	++	++	+	—	—	—	—	—	—	—	<i>L.ict.</i> A
R 9	++	++	+	—	—	—	—	—	—	—	» A
R 11	++	++	+	+	—	—	++	++	+	±	» AB
R 12	+++	++	+	+	—	—	—	—	—	—	» A
R 13	+++	++	+	+	—	—	—	—	—	—	» A
R 14	+++	++	++	+	+	—	+++	++	+	+	» AB
R 16	+++	++	+	+	—	—	++	+	+	±	» AB
R 17	++	+	+	—	—	—	—	—	—	—	» A
R 18	+++	+++	++	++	+	—	+++	++	++	+	» AB
R 19	+++	++	++	+	—	—	++	++	+	±	» AB
R 22	+++	+++	++	+	±	—	+++	++	+	±	» AB
R 23	+++	++	+	+	—	—	++	+	+	±	» AB
R 25	+++	++	+	±	—	—	++	+	+	±	» AB
R 28	+++	++	++	+	—	—	+++	++	++	+	» AB
R 29	++	+	±	—	—	—	—	—	—	—	» A
R 30	++	++	+	+	—	—	++	++	+	±	» AB
R 31	+++	++	+	+	—	—	+++	++	+	+	» AB
R 32	+++	+++	+	+	—	—	+++	++	+	±	» AB
R 33	++	+	+	±	—	—	++	+	+	—	» AB
R 34	+++	++	+	±	—	—	++	+	+	—	» AB
R 41	++	+	±	—	—	—	—	—	—	—	» A
R 42	+++	++	+	—	—	—	—	—	—	—	» A
R 43	+++	++	+	±	—	—	++	+	+	—	» AB
R 49	++	+	±	—	—	—	—	—	—	—	» A
R 50	++	++	+	—	—	—	++	+	±	—	» AB
R 52	++	++	+	—	—	—	—	—	—	—	» A
R 53	+++	++	++	—	—	—	—	—	—	—	» A
R 54	+++	+++	++	+	—	—	+++	++	+	±	» AB
R 55	+++	++	++	+	—	—	++	++	+	—	» AB
R 56	+++	++	+	+	—	—	++	++	+	—	» AB
R 58	++	+	+	—	—	—	—	—	—	—	» A
R 59	++	+	+	—	—	—	—	—	—	—	» A
R 60	++	++	+	±	—	—	++	++	+	—	» AB
R 61	++	++	±	—	—	—	++	+	—	—	» AB

Cont. Table 6

Lepto- spiral Strains	Immune Serum <i>L.ict.</i> AB						Absorbed Serum <i>L.ict.</i> B				Bio- type
	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	$\frac{1}{25600}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	
R 62	++	+	±	—	—	—	—	—	—	—	<i>L.ict.</i> A
R 63	++	+	—	—	—	—	—	—	—	—	" A
R 64	++	++	+	—	—	—	—	—	—	—	" A
R 65	++	+	—	—	—	—	—	—	—	—	" A
R 66	++	+	+	—	—	—	—	—	—	—	" A
R 67	++	++	+	—	—	—	—	—	—	—	" A
R 68	++	+	±	—	—	—	—	—	—	—	" A
R 70	++	++	+	—	—	—	++	+	+	—	" AB
R 72	++	+	—	—	—	—	—	—	—	—	" A
R 73	+++	+++	++	+	—	—	+++	++	+	±	" AB
R 74	++	+	+	—	—	—	++	+	+	—	" AB
R 75	++	+	±	—	—	—	—	—	—	—	" A
R 76	++	+	+	—	—	—	++	+	+	—	" AB
R 77	++	+	+	—	—	—	—	—	—	—	" A
R 80	++	++	+	—	—	—	—	—	—	—	" A
R 82	+++	+++	++	+	±	—	+++	++	+	+	" AB
R 83	++	++	+	—	—	—	+	+	—	—	" AB
R 84	++	+	±	—	—	—	++	+	±	—	" AB
R 85	+++	++	+	+	—	—	—	—	—	—	" A
R 86	++	++	+	+	—	—	+++	++	+	±	" AB
R 87	+++	++	+	+	—	—	+++	++	+	—	" AB
R 88	++	++	+	+	—	—	+++	++	+	—	" AB
R 89	++	+	+	+	—	—	—	—	—	—	" A
R 90	++	+	+	—	—	—	—	—	—	—	" A
R 91	+++	+++	++	+	±	—	+++	++	+	+	" AB
R 92	++	+	±	—	—	—	+++	+	—	—	" AB
R 94	+++	++	+	+	—	—	—	—	—	—	" A
R 96	++	+	+	—	—	—	—	—	—	—	" A

For the determination of the biotypes AB and A, a specific anti-*L.ict.* B serum was prepared by absorbing the *L.ict.* AB immune serum with *L.ict.* A leptospirae using formalinized leptospirae. Thirty-two strains (biotype AB) showed reactions with the factor serum, while 30 strains (biotype A) did not react with it.

In a preliminary investigation, 19 strains isolated from the other animals were titrated with 15 type immune sera in the agglutination lysis test (Table 7). It became evident that nine of the strains belonged to the sejroe-saxkoebing serogroup, eight to the bataviae-paidjan serogroup, and two to the javanica-poi serogroup.



TABLE 7  
TITRATION RESULTS OF STRAINS ISOLATED FROM MICE, VOLES AND SHREWS WITH TYPE IMMUNE SERA  
(Homologous titers = 100, titers below 3 were considered negative)

Strains	Type Immune Sera										Sero- type					
	Ict.AB	Ict.A	Jaw.	Poi	Can.	Ball.	Aus.A	Pom.	Gri.	Sej.		Sax.	Bat.	Paid.	And.	Hgos
M 1	3	3	50	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Poi
M 34	—	—	—	—	—	—	—	—	—	200	25	—	—	—	—	Sej.
M 154	—	—	—	—	—	—	—	—	—	200	12.5	—	—	—	—	Sej.
M 159	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100	25	—	6	Bat.
M 176	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100	12.5	—	—	—	—	Sej.
M 178	—	—	—	—	—	—	—	—	—	200	12.5	—	12.5	—	6	Bat.
M 181	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Sej.
M 186	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	50	12.5	—	6	Bat.
M 187	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100	25	—	6	Bat.
M 316	3	3	100	200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Poi
M 339	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	50	12.5	—	6	Bat.
M 341	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	50	12.5	—	6	Bat.
M 350	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100	12.5	—	6	Bat.
M 351	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	50	12.5	—	3	Bat.
M 365	—	—	—	—	—	—	—	—	—	200	12.5	—	—	—	—	Sej.
M 366	—	—	—	—	—	—	—	—	—	200	25	—	—	—	—	Sej.
M 370	—	—	—	—	—	—	—	—	—	200	12.5	—	—	—	—	Sej.
M 381	—	—	—	—	—	—	—	—	—	200	12.5	—	—	—	—	Sej.
M 396	—	—	—	—	—	—	—	—	—	200	12.5	—	—	—	—	Sej.

TABLE 8  
ABSORPTION TESTS IN SEJROE-SAXKOEHING SEROGROUP

Immune Serum Absorbed with Strain	SEJROE IMMUNE SERUM		SAXKOEHING IMMUNE SERUM	
	Titers before Absorption for Serotypes:		Titers before Absorption for Serotypes:	
	<i>L. sejroe</i> 1 : 12,800	<i>L. saxkoebing</i> 1 : 6,400	<i>L. sejroe</i> 1 : 1,600	<i>L. saxkoebing</i> 1 : 12,800
	Titers after Absorption:		Titers after Absorption:	
M 34	0	0	0	1 : 12,800
M 154	0	0	0	1 : 12,800
M 176	0	0	0	1 : 12,800
M 181	0	0	0	1 : 12,800
M 365	0	0	0	1 : 12,800
M 366	0	0	0	1 : 12,800
M 370	0	0	0	1 : 12,800
M 381	0	0	0	1 : 12,800
M 396	0	0	0	1 : 12,800

For the determination of the serotype, the immune sera were absorbed with the isolated strains developing high titer values in the agglutination lysis test. The absorption tests revealed, as expected on the basis of the agglutination lysis test, that all leptospiral strains of the sejroe-saxkoebing serogroup were of the sejroe serotype (Table 8), all leptospirae of the bataviae-paidjan serogroup were of the bataviae (van Tienen) serotype (Table 9), and both the leptospirae of the javanica-poi serogroup belonged to the poi serotype (Table 10). An immune serum was prepared for the strain M 1, and the titration results and absorption tests with it showed that the strain M 1 was identical with both the strain M 316 and the poi serotype (Table 11).

The serotypes isolated from the different animals were as follows:

<i>Mus musculus</i>	6 <i>L. sejroe</i>
<i>Micromys minutus</i>	4 <i>L. bataviae</i>
<i>Microtus arvalis</i>	2 <i>L. sejroe</i> , 2 <i>L. bataviae</i>
<i>Microtus agrestis</i>	1 <i>L. sejroe</i> , 2 <i>L. bataviae</i>
<i>Apodemus flavicollis</i>	1 <i>L. poi</i>
<i>Sorex araneus</i>	1 <i>L. poi</i>

TABLE 9

## ABSORPTION TESTS IN BATAVIAE-PAIDJAN SEROGROUP

Immune Serum Absorbed with Strain	BATAVIAE IMMUNE SERUM		PAIDJAN IMMUNE SERUM	
	Titers before Absorption for Serotypes:		Titers before Absorption for Serotypes:	
	<i>L. bataviae</i> 1 : 12,800	<i>L. paidjan</i> 1 : 3,200	<i>L. bataviae</i> 1 : 12,800	<i>L. paidjan</i> 1 : 25,600
	Titers after Absorption:		Titers after Absorption:	
M 159	0	0	0	1 : 12,800
M 178	0	0	0	1 : 12,800
M 186	0	0	0	1 : 12,800
M 187	0	0	0	1 : 12,800
M 339	0	0	0	1 : 12,800
M 341	0	0	0	1 : 12,800
M 350	0	0	0	1 : 12,800
M 351	0	0	0	1 : 12,800

TABLE 10

## ABSORPTION TESTS IN JAVANICA-POI SEROGROUP

Immune Serum Absorbed with Strain	JAVANICA IMMUNE SERUM		POI IMMUNE SERUM	
	Titers before Absorption for Serotypes:		Titers before Absorption for Serotypes:	
	<i>L. javanica</i> 1 : 6,400	<i>L. poi</i> 1 : 6,400	<i>L. javanica</i> 1 : 800	<i>L. poi</i> 1 : 3,200
	Titers after Absorption:		Titers after Absorption:	
M 1	1 : 3,200	0	0	0
M 316	1 : 3,200	0	0	0

TABLE 11

## ABSORPTION TESTS WITH IMMUNE SERUM OF STRAIN M 1

Immune Serum Absorbed with Strain	M 1 IMMUNE SERUM			
	Titers before Absorption for Strains:			
	<i>L. javanica</i> 1 : 800	<i>L. poi</i> 1 : 3,200	Strain M 1 1 : 3,200	Strain M 316 1 : 6,400
	Titers after Absorption:			
<i>L. javanica</i> .....	0	1 : 800	1 : 800	1 : 1,600
<i>L. poi</i> .....	0	0	0	0
Strain M 316 .....	0	0	0	0

## CONCLUSIONS

1. *Rattus norvegicus* is the carrier of *L. icterohaemorrhagiae*.
2. *Mus musculus* is the main carrier of *L. sejroe*.
3. *Micromys minutus* is obviously the main carrier of *L. bataviae*.
4. Several strains of *L. sejroe* and *L. bataviae* were isolated from *Microtus arvalis* and *Microtus agrestis*. However, not a single strain of *L. grippolyphosa* could be cultivated from *Microtus arvalis*.
5. A strain of *L. poi* was isolated from both *Apodemus flavicollis* and *Sorex araneus*.
6. No leptospiral strains could be cultivated from the *Clethrionomys* genus.
7. The rats were infected with leptospirae everywhere, the rate of infection ranging between 20—70 per cent. In certain areas leptospiral carriers could not be found among mice and voles, while they were infected to a considerable extent in some other places. Leptospiral infections were not found among the small mammals investigated in Lapland.

## PART II

### INVESTIGATIONS ON LEPTOSPIROSIS IN DOMESTIC ANIMALS

#### SURVEY OF THE LITERATURE

*Dogs.* — The systematical investigations of the sera from healthy dogs in various countries have shown leptospiral antibodies in 10—40 per cent (Table 12). The most common types are *L. canicola* and *L. icterohaemorrhagiae*, their frequencies of occurrence varying according to geographical localities. However, *L. canicola* is generally more common. Antibodies against types transmitted from small rodents and domestic animals have also been found in dogs, e.g., *L. grippotyphosa*, *sejroe*, and *pomona* in Central Europe (217) and *L. bataviae*, etc., in Indonesia (146).

The clinical picture of canine leptospirosis varies. Hemorrhagic, icteric, and uremic forms have been described, often occurring also simultaneously (119, 117, 105, 29). The typical clinical picture is the following: an acute attack of fever, vomiting, ulcerations or necroses of the tongue and mucous membranes of the mouth causing *fetor ex ore*, partial or complete anuria, uremia, sometimes hemorrhages, and, especially in puppies, icterus. The lethality rises up to 10—20 per cent. However, taking into consideration the frequent findings of antibodies in the blood, it is obvious that the majority of the infections is mild or sub-clinical resulting in only leptospiruria. Leptospirae induce chronic nephritis in the kidneys, and it is likely, indeed, that leptospirosis is the most common reason for chronic nephritis often occurring in old dogs (163, 105).

Attention has been paid to the fact that though a positive sero-reaction is very common among dogs, leptospirosis caused by *L. canicola* is relatively rare in man. Systematical studies performed on dog-owners, whose dogs suffered from leptospirosis, have shown no evidence of infections in the members of their families (229, 46, 136).

TABLE 12

SURVEY OF SEROLOGICAL EXAMINATIONS OF CANINE SERA IN DIFFERENT COUNTRIES

Author	Year	Country	Number of Dogs Tested	Positive %	Positive by Different Serotypes		
					Ict.	Can.	Other Serotypes
Nordström (162) . . . . .	1941	Sweden	616	9	50	7	Not examined
Horne-Jensen (93) . . . . .	1938	Denmark	208	52	33	70	Not examined, Ict. = Can. 6
Steigner (217) . . . . .	1950	Germany	735	55	12	287	Gri. 75, Pom. 2, Sej. 2, unknown 28
Chemnitz (51) . . . . .	1953	Germany	771	32	39	207	Not examined
Babudieri, Castagnoli (20)	1940	Italy	159	36	52	5	Pom. 1
van der Walle (243) . . . . .	1939	Belgium	100	44	15	29	Not examined
Stuart (219) . . . . .	1946	England	100	40	—	40	Not examined
Broom (42) . . . . .	1948	England	121	45	10	33	Not examined
Azevedo (12) . . . . .	1943	Portugal	121	18	6	16	Not examined
Newman (156) . . . . .	1950	USA	500	23	13	131	Not examined
Savino, Renella (194) . . . . .	1944	Argentina	390	32	50*	75	Not examined
Mochtar, Collier (146) . . . . .	1939	Java	152	38	13	1	Bal. 34, Jav. 7, Aus. A 1, Pom. 1, unknown 2

\* Named *L. bonariensis* which is according to Savino and Renella (200) identical with *L. icterohaemorrhagiae*.

*Swine.* — *L. icterohaemorrhagiae* infections in swine have been reported in the Netherlands, France, Switzerland, England, and in the United States (215). In Germany, Kindler and Schindler (113) found antibodies for *L. icterohaemorrhagiae* in 42 per cent from 200 swine tested, more frequently in pigsties where rats occurred very abundantly.

However, the most common porcine types are *L. pomona* and *L. hyos*. In Australia these types were isolated from human infections and attention was paid to the close contact between the disease cases and the cattle. Johnson (102, 103) was the first to point out that *L. pomona* and *L. hyos* occurred endemically in swine and cattle after his findings of positive seroreactions and the isolation of *L. pomona* strains.

The antibodies of the pomona and hyos types were then found in swine in various countries. In 1942, Terskikh (227) isolated in the USSR a leptospira called *L. monjakov* from swine herds, which proved to be identical with *L. pomona*. In the Argentine, Savino and Renella (195, 197) cultivated two different types, *L. suis* and

*L. hyos*, from swine. The former proved to be identical with *L. pomona* (199) and the latter with Johnson's Mitis strain (16). In Switzerland, Gsell (83, 84) investigated serologically blood samples from swine and found in 1944 antibodies against the types *L. pomona* and *L. icterohaemorrhagiae*, and in 1948 with Wiesmann (87) also against *L. hyos*. Collier (53) cultivated six strains of *L. pomona* from the kidneys of 104 swine in Indonesia. The pomona type has been established in swine in serological studies also in Israel (23), France (125), Italy (15), Germany (51), and the United States (67, 30, 41, 45).

In addition to the types of *L. pomona*, *hyos*, and *icterohaemorrhagiae*, antibodies have occasionally been found in porcine sera also against other types. In Central Europe Chemnitz (51) obtained some positive titers also for the serotypes *L. autumnalis*, *australis*, *grippotyphosa*, and *canicola*.

The manifestations of leptospirosis in swine have been described as an acute febrile phase sometimes with meningeal symptoms followed by chronic interstitial nephritis and profuse leptospiruria over long periods of time (201, 45). Most of the cases were mild, while a few pigs developed a fatal icteric illness (45).

*Cattle*. — In 1935, Nikolskiy *et al.* (158) reported from Southern Russia a new infectious disease resembling piroplasmosis with symptoms of icterus, hematuria, and skin necroses. The lethality ranged between 10–60 per cent. Mishin and Azinov (137) found the causative microbes in dead calves to be spirochaetae resembling organisms and Avrorov and Semskov (11) demonstrated them in histological preparations. In 1939, Terskikh (225) and Semskov (209) succeeded in cultivating these leptospirae and called the new type *L. vitulina seu bovina* (Terskikh) and *L. icterohaemoglobinuriae* (Semskov). Serological investigations confirmed these types to be very close to *L. grippotyphosa*, though probably not identical with it. Large epidemics of this disease occurred in Russia also later and preventive vaccinations were performed in infected areas (155).

Similar endemic disease has been reported in Israel since 1941 (70, 69). In 1947, Bernkopf, Olitzki, and Stuczynski (24) succeeded in cultivating leptospirae from cattle and man infected by the former. They called the strain *L. bovis*. Bernkopf (22) found later antibodies against this type in the blood samples of 796 slaughtered cows in 8.5 per cent at a dilution of  $\geq 1:200$ . *L. bovis* proved also

to be closely related to *L. grippotyphosa* (25, 166). The absorption tests conducted by Wolff (254) showed only slight variations in the antigenic structure between Moscow V, Duyster, and Bernkopf's bovis strains. It became evident on the basis of Wolff's examinations that the bovis strain belongs to the grippotyphosa serogroup. According to van der Hoeden (92), the Moscow V strain was complete, while the most strains of *L. bovis* were incomplete.

In the USSR and Israel, *L. grippotyphosa* occurs endemically in voles in the same areas as bovine leptospirosis, but it has not yet been established whether these small rodents play any part in it. Over 1,000 human infections of the grippotyphosa serogroup have been diagnosed in Israel by now. The majority of these cases was not in contact with cattle, but contracted the disease probably from the voles in the fields (165, 92).

In Australia (102, 103, 221), New Zealand (115, 114), and Argentina (196, 198) antibodies were found frequently in cattle against *L. pomona* and *L. hyos*, and in the United States against *L. pomona* (80, 180). It has been supposed that in these cases swine act as reservoirs of infection for cattle.

The serological examinations of bovine sera in Central Europe have shown antibodies against the types *L. grippotyphosa*, *icterohaemorrhagiae*, *sejroe*, *pomona*, *hyos*, *canicola*, and *australis* (110, 249, 254, 51). Borg-Petersen (35) found only one positive titer for *L. sejroe* out of 128 bovine sera in Denmark.

*Horses.* — The leptospiral antibodies against various types are very common in horses (30—40 per cent), though no specific equine type has been described (110, 90, 51). In Denmark, Borg-Petersen (35) found antibodies with sejroe-saxkoebing leptospirae in 11 of 39 horses, but renal cultivations from 22 horses gave negative results.

Heusser and co-workers (89, 90), on the basis of their antibody investigations performed in Switzerland in 1948, came to the conclusion that the moon blindness or periodic ophthalmia of horses is caused by leptospirae. The disease, occurring in 5—20 per cent in horses in Central Europe, is recurring uveitis that often causes a considerable loss of vision. The symptoms are obviously due to the fact that leptospirae remain chronically alive in the aqueous, as in the kidneys (112).

*Other Domestic Animals.* — In Indonesia, Esseveld and Collier



(63) found antibodies in the cat sera in 20—40 per cent against *L. bataviae* and *L. javanica*, and they were able to cultivate 14 leptospiral strains from the kidneys of cats. In Europe, a few low titers for *L. icterohaemorrhagiae* (49, 168, 167) were found in the serological examinations of cats, or the results obtained were entirely negative (247). The systematical renal cultivations of cats did not yield positive results in Europe (167). According to the experiments performed by Otten *et al.* (167), cats are resistant against *L. icterohaemorrhagiae* infections to a considerable degree and the production of leptospiral antibodies in cats seems to be poor, which explains the low values of the established titers.

Leptospiral infections have been often reported among the silver foxes, who mostly contracted the disease from rats (49, 188, 138, 218).

#### SERIES AND RESULTS

*Dogs.* — The leptospiral antibodies were investigated in the sera of 37 dogs. Twenty leptospiral samples were sent by veterinarians from healthy dogs to be taken to Sweden for the certificate that the dog is free from leptospirosis. Five sera were from stray dogs killed at the Dog Pound of the City of Helsinki, and 12 samples containing serous fluid from the heart were collected at autopsies in the School of Veterinary Medicine, Helsinki. It was rather difficult to obtain canine sera because we have no veterinary hospitals, where the routine samples could have been taken systematically and because the veterinarians were not interested in taking blood samples in their private offices, which is easy to understand. In the antibody investigations, the serotypes of *L. icterohaemorrhagiae* AB, *poi*, *canicola*, *pomona*, *grippityphosa*, *sejroe*, *bataviae*, and *hyos* were employed.

Out of the 37 canine sera investigated, antibodies were found in 7 sera or 18.9 per cent (Table 19). The titers ranged between 1 : 100—1 : 800 and the types were as follows: *L. icterohaemorrhagiae* 4, *L. bataviae* 2, and *L. canicola* 1 (Table 13). Though the serum D 15 yielded a higher titer for *L. sejroe* than for *L. bataviae*, I suppose, however, that this was an infection with *L. bataviae* according to the experience gained from the examinations of the patients' sera.

TABLE 13  
RESULTS OF SEROLOGICAL EXAMINATIONS ON POSITIVE CANINE SERA

Figure of Dog	Titers for Different Serotypes								Sero-type
	Ict. AB	Poi	Can.	Pom.	Gri.	Sej.	Bat.	Hyos	
D 3	800	—	—	—	—	—	—	—	Ict.
D 5	400	—	—	—	—	—	—	—	Ict.
D 10	100	—	—	—	—	100	200	—	Bat.
D 15	50	—	—	—	—	200	100	50	Bat.?
D 16	—	—	100	—	—	—	—	—	Can.
D 22	100	—	—	—	—	—	—	—	Ict.
D 33	200	—	—	—	—	—	—	—	Ict.

Due to the small and inadequate material, in the present study it was impossible to draw any conclusions on the rate of infection and the relative frequency of different serotypes in dogs in Finland. It seems likely, however, that *L. icterohaemorrhagiae* is the most common.

The sera of *swine*, *cattle* and *horses* were taken in the fall of 1954 systematically in connexion with slaughters at the Slaughterhouse of the City of Helsinki, where the animals were brought mainly from Southern Finland. The blood samples of the animals were investigated with the types *L. icterohaemorrhagiae* AB, *poi*, *pomona*, *grippotyphosa*, *sejroe*, *bataviae*, and *hyos*.

*Swine*. — Antibodies were found in 67 or 16.5 per cent of 406 porcine sera examined (Table 19). Fifty-six sera developed positive titers for only one type, nine sera reacted with two leptospiral types, and two sera with three types. Table 14 shows all the titers obtained with different serotypes. The most common were the antibodies for *L. hyos*, 43 positive, then followed the types *L. bataviae* 11, *poi* 9, *pomona* 6, *sejroe* 6, and *icterohaemorrhagiae* 5.

Table 15 summarizes the titers of the sera that reacted simultaneously with two to three different types. In these cases it was impossible to find out directly the serotype of the infection. There could namely be either a cross-reaction, or the swine had passed leptospirosis of different types twice or three times. The different serotypes do not generally yield immunity against other types (86), so that the animals may contract the disease more than once. The serotypes could not be determined according to the titer height

TABLE 14  
TITERS OF POSITIVE PORCINE SERA FOR DIFFERENT SEROTYPES

Sero- type	Number of Different Titers							Total
	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	
<i>Ict.AB</i>	1	4	—	—	—	—	—	5
<i>Poi</i>	3	2	3	1	—	—	—	9
<i>Pom.</i>	3	2	—	—	1	—	—	6
<i>Gri.</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Sej.</i>	—	2	2	1	—	—	1	6
<i>Bat.</i>	—	5	3	2	1	—	—	11
<i>Hyos</i>	14	10	6	6	4	3	—	43
Total	21	25	14	10	6	3	1	80

TABLE 15  
TITERS OF THE PORCINE SERA WHICH REACTED SIMULTANEOUSLY WITH TWO OR MORE SEROTYPES

Figure of Swine	Titers for Different Serotypes						
	<i>Ict. AB</i>	<i>Poi</i>	<i>Pom.</i>	<i>Gri.</i>	<i>Sej.</i>	<i>Bat.</i>	<i>Hyos</i>
S 105	—	—	—	—	200	—	400
S 122	—	—	—	—	200	800	400
S 130	—	—	—	—	—	100	200
S 154	—	—	—	—	—	400	400
S 178	100	—	100	—	400	—	—
S 221	—	—	—	—	—	100	200
S 223	—	—	—	—	—	100	100
S 224	—	—	—	—	—	100	800
S 289	—	100	—	—	—	—	50
S 312	100	—	—	—	—	—	200
S 313	—	50	—	—	—	—	50

because two types often developed similar or almost similar titers. The absorption tests performed to resolve the question did not reveal clear results, mainly because of the low titers. Accordingly, it remained uncertain which of the titers in Table 15 were cross-reactions and which were due to recurring leptospirosis with different types.

In addition, it might be mentioned that in swine significant positive titers for *L. hyos*, *pomona*, and *poi* almost always occurred in a number of successive samples, while a series of 100 porcine

TABLE 16

TITERS OF POSITIVE BOVINE SERA FOR DIFFERENT SEROTYPES

Sero- types	Number of Different Titers							Total
	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	
<i>Ict.AB</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Poi</i>	—	—	—	1	1	—	—	2
<i>Pom.</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Gri.</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Sej.</i>	—	1	1	2	—	—	1	5
<i>Bat.</i>	—	—	1	—	1	—	—	2
<i>Hyos</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
Total	—	1	2	3	2	—	1	9

TABLE 17

TITERS OF POSITIVE EQUINE SERA FOR DIFFERENT SEROTYPES

Sero- type	Number of Different Titers							Total
	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	
<i>Ict.AB</i>	3	1	—	2	—	—	—	6
<i>Poi</i>	2	3	2	—	1	2	—	10
<i>Pom.</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Gri.</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Sej.</i>	1	2	1	3	1	—	1	9
<i>Bat.</i>	1	7	3	2	2	—	—	15
<i>Hyos</i>	1	3	—	—	—	—	—	4
Total	8	16	6	7	4	2	1	44

sera, when tested twice, gave negative reactions. The fact suggests that leptospirosis should occur in only certain pigsties because the animals of the same owner were slaughtered successively.

*Cattle.* — The number of bovine sera investigated was 303 and only nine sera, or 3.0 per cent, gave positive reactions (Table 19). Each one developed a titer for one serotype only. The titers are summarized in Table 16 and were as follows: *L. sejroe* 5, *poi* 2, and *bataviae* 2, while the antibodies of the grippotyphosa serogroup were not established. The series involved 105 calves and 198 cows, but no difference in antibodies occurred between these groups.

TABLE 18

TITERS OF THE EQUINE SERA WHICH REACTED SIMULTANEOUSLY WITH TWO OR MORE SEROTYPES

Figure of Horse	Titers for Different Serotypes						
	<i>Ict. AB</i>	<i>Poi</i>	<i>Pom.</i>	<i>Gri.</i>	<i>Sej.</i>	<i>Bat.</i>	<i>Hyos</i>
H 3	—	100	—	—	800	100	—
H 8	—	—	—	—	—	400	100
H 12	—	—	—	—	200	400	—
H 19	400	1600	—	—	—	—	—
H 20	—	100	—	—	—	200	—
H 35	—	—	—	—	400	100	—
H 42	50	50	—	—	100	—	—
H 69	—	—	—	—	—	200	100
H 89	50	50	—	—	50	100	—

*Horses.* — Leptospiral antibodies were found in as many as 31 sera, or 32.6 per cent of the 95 equine sera tested (Table 19). Twenty-two sera developed positive titers for one serotype only, while the rest, *i.e.*, nine sera reacted with two or more types. Six sera of them were positive with two types, two sera with three types, and one serum with four types (Table 18). What was said (p. 14) of the porcine sera reacting simultaneously with different types holds also true in these cases. The number of the titers obtained with different serotypes was the following: *L. bataviae* 15, *poi* 10, *sejroe* 9, *icterohaemorrhagiae* 6, and *hyos* 4 (Table 17).

TABLE 19

INCIDENCE AND SEROTYPES OF LEPTOSPIRAL ANTIBODIES IN SERA OF DOMESTIC ANIMALS

Domestic Animal	Number of Tested	Positive	Pos. %	Positive with Different Serotypes							
				<i>Ict.</i>	<i>Poi</i>	<i>Can.</i>	<i>Pom.</i>	<i>Gri.</i>	<i>Sej.</i>	<i>Bat.</i>	<i>Hyos</i>
DOGS	37	7	18.9	4	—	1	—	—	—	2	—
SWINE	406	67	16.5	5	9	•	6	—	6	11	43
CATTLE	303	9	3.0	—	2	•	—	—	5	2	—
HORSES	95	31	32.6	6	10	•	—	—	9	15	4
Total	841	114	13.5	15	21	1	6	—	20	30	47

## CONCLUSIONS

1. Antibodies against either all or some of the serotypes isolated from micromammals in Finland, namely *L. bataviae*, *poi*, *sejroe*, and *icterohaemorrhagiae*, were found in the sera of the domestic animals investigated, viz., of dogs, swine, cattle, and horses.

2. In addition to these types, *L. pomona* and *hyos* antibodies were common in the porcine sera, and antibodies against *L. canicola* were present in one canine serum. On the other hand, signs of endemic leptospirosis did not occur among cattle.

3. Antibodies for *L. grippotyphosa* were not established in the sera of domestic animals.

4. The titers ranged from 1:50 to 1:3,200. A part of the porcine and equine sera developed titers simultaneously for two to four types. In some of these cases the question may be that of a cross-reaction, in others the animals may have had recurring leptospirosis with different serotypes.

## PART III

### INVESTIGATIONS ON HUMAN LEPTOSPIROSIS

#### SURVEY OF THE LITERATURE

Summaries on the number and serotypes of diagnosed cases of human leptospirosis have been published in several European countries. In the majority, the diagnosis was based on the determination of antibodies in the patients' sera, but in some cases the infecting leptospiral strain was also isolated. Table 20 shows the results from the serological examinations, when the samples were tested with various serotypes. The summary may not give a true picture of the relative occurrence of different leptospiral types, since in many laboratories antibody examinations were not performed with all serotypes occurring in that area. Infections may not have been notified and erroneous type determinations may have been made, as for lack of a specific type the infection may be thought to be caused by the type yielding a cross-reaction. At least the following 12 leptospiral types have produced human infections in Europe.

The causative organism of the original Weil's disease, *L. icterohaemorrhagiae*, has been found in all countries of Europe. In Table 20 almost half of the cases are due to this type.

*L. canicola*, the serotype transmitted from dogs, occurs likewise in all European countries, being, however, much more infrequent. In Table 20 it is 8 times rarer than *L. icterohaemorrhagiae*.

*L. grippotyphosa* is very common in Central Europe where it sometimes causes large epidemics of field fever. This type occurs sporadically also in other countries of Europe.

In Denmark, the prevalent type is *L. sejroe* producing a febrile illness resembling field fever, mainly in rural population. *L. sejroe* also occurs in Central Europe to some degree. At least two human

TABLE 20  
 DIFFERENT SEROTYPES OF HUMAN LEPTOSPIROSIS

Author	Country	Years	Number of Cases	Ict.
Borg-Petersen (37) .....	Denmark	1934—48	808	25
Rimpau (185) .....	Germany, Bavaria	1937—47	719	25
Jirovec <i>et</i> Stolcova-Sutorisova (101)	Czechoslovakia	1941—44	318	9
Kmety (122) .....	Czechoslovakia	1949—53	139	3
Gsell (85) .....	Switzerland	1943—51	667	6
Babudieri <i>et</i> Austoni (18) .....	Italy	1936—51	1425	95
Mihaljevic <i>et</i> Falisevac (139) .....	Yugoslavia	1947—51	102	2
Wolff (253) .....	Netherlands	1924—51	834	73
Broom (43) .....	England and Wales	1947—50	535	46
Total			5547	262

infections with a closely related serotype, *L. saxkoebing*, were found in Denmark (37), and in the rice fields of Italy Mino (144) diagnosed some cases of this type.

*L. balaviae* is the most common type in the rice fields of Northern Italy causing there more than half of the leptospiral infections. Elsewhere, 16 cases have been established in Denmark and one case in Yugoslavia.

*L. pomona* and *L. hyos*, the types transmitted from swine, are common in Switzerland and have also been diagnosed at least in Italy, France (2), Czechoslovakia, Yugoslavia (139, 228), and Spain (171).

*L. australis* A and *L. australis* B, which were first isolated in Australia, have been met in Central Europe and Italy.

From the Italian rice field leptospirosis, Mino (143, 144) cultivated two strains of a new serotype, *L. poi*. Thereafter, antibodies have been found against this type in 15 patients in Italy and in two patients in Denmark.

Human infections with *L. ballum* were recently found in rice field workers in France (172) and Spain (57), in addition to the laboratory infection published previously in Holland (40).

According to Broom (43), human infections have been found in England only with *L. icterohaemorrhagiae* and *L. canicola*. The observation made by Elton *et al.* (61) in 1930 suggests, however, the occurrence of some other types. When studying the role played by



TABLE 20  
LEPTOSPIROSIS DIAGNOSED IN 8 EUROPEAN COUNTRIES

Number of Cases	Different Serotypes										
	Ict.	Poi	Can.	Ball.	Aus.	B Aus.	A Pom.	Gri.	Sej.	Bat.	Hyos Unknown
808	254	2	95	—	•	•	—	15	414	16	• 12
719	29	•	13	•	•	2	—	663	12	—	• —
318	91	•	—	•	•	—	—	211	16	—	• —
139	35	•	1	•	2	7	29	41	24	•	• —
667	64	•	26	•	•	36	315	86	56	—	78 6
425	953	15	54	•	4	•	216	8	14	142	19 —
102	2	•	6	•	•	3	68	2	8	1	12 —
834	736	—	61	1	—	—	—	36	—	—	— —
535	465	•	70	•	•	•	—	—	—	—	— —
547	2629	17	326	1	6	48	628	1062	544	159	108 18

diseases in the periodic fluctuations of small mammals, they found leptospirae in the kidneys of *Microtus agrestis* by histological technique. They did not determine the serotype, but it has not as yet been possible to show *L. icterohaemorrhagiae* and *L. canicola* in mice.

In Sweden, Malmgren (135) found 101 acute cases and 15 earlier passed infections of *L. icterohaemorrhagiae* by serological examinations in 1935—1939. Borgen and Thjøtta (33) diagnosed 35 infections with *L. icterohaemorrhagiae* in Norway in 1936—1940, where four cases of *L. canicola* have been found since then (8, 130, 32). Cases of human leptospirosis with other serotypes have not been published in Scandinavia.

The present survey is concerned with Europe only. Similar large series of cases examined with many types have also been published in Central Africa by van Riel (181), in Australia by Johnson (104), and in New Zealand by Kirschner *et al.* (115, 66).

#### SERIES AND RESULTS

The present investigation of the occurrence of human infections with different leptospiral types was based on the examinations of antibodies in the human sera by means of the agglutination lysis test. In 1953—55, 1,095 routine samples sent to the laboratory

TABLE 21  
SERIES OF HUMAN SERA TESTED

Year	Sera Tested	Posi- tive	Serotypes Employed
1952	Routine samples 168*	6	<i>Ict.</i> AB, <i>Ict.</i> A, <i>Can.</i> , <i>Pom.</i> , <i>Gri.</i> , <i>Sej.</i>
	Widal samples 1000*	6	—o—
1953	Routine samples 96	16	—o—
	—o— 194		<i>Ict.</i> AB, <i>Can.</i> , <i>Pom.</i> , <i>Gri.</i> , <i>Sej.</i> , <i>And.</i>
1954	Routine samples 191	15	—o—
	—o— 161		<i>Ict.</i> AB, <i>Poi.</i> , <i>Can.</i> , <i>Pom.</i> , <i>Gri.</i> , <i>Sej.</i> , <i>Bat.</i> , <i>And.</i>
	—o— 217		<i>Ict.</i> AB, <i>Poi.</i> , <i>Can.</i> , <i>Pom.</i> , <i>Gri.</i> , <i>Sej.</i> , <i>Bat.</i> , <i>And.</i> , <i>Hyos</i>
	Sera from the Kumlinge Island 48	1	—o—
1955	Routine samples (until Sept. 1, 1955) 296	8	—o—
Total 2311		52	Positive 2.3 %

\* Published earlier by Koulumies and Salminen (129).

of the Department of Serology and Bacteriology from patients suspected of leptospirosis were studied for this purpose. The positive sera found among 168 routine samples and 1,000 Widal samples, the results of which were published earlier by Koulumies and Salminen (129) in a preliminary report, were included the series and titrated again with a greater number of serotypes. In addition, 48 blood samples taken from endemic meningitis occurring in the Island of Kumlinge were examined. The series is presented in Table 21.

The serotypes employed in the antibody examinations varied from time to time. The investigations were begun in 1952 with the types *L. ict.* AB, *ict.* A, *canicola*, *pomona*, *grippotyphosa*, and *sejroe*. In summer 1953, *L. andaman* was included and *L. ict.* A was considered unnecessary. Further, the types *L. poi*, *bataviae*, and *hyos* were added into the series in 1954. Since August, 1954, the blood samples were regularly tested with the following nine serotypes: *L. ict.* AB, *poi*, *canicola*, *pomona*, *grippotyphosa*, *sejroe*, *bataviae*, *andaman*, and *hyos*. Some samples were also examined with other types, such as *L. australis* A, *ballum*, and *saxkoebing*. On the other hand, a few samples could not be tested with all the types due to

the occasional poor growth of the strain. The information in Table 21 is thus not fully detailed.

The sera with titers of 1 : 200 or more for at least one serotype were considered positive and the sera developing lower titers were excluded. An attempt was made to obtain 2—3 blood samples from the positive cases. All the positive sera were separated and kept in deep freeze at  $-20^{\circ}$  C. They were titrated again in the beginning of 1955 with the following 15 serotypes: *L. ict.* AB, *ict.* A, *javanica*, *poi*, *canicola*, *ballum*, *australis* A, *pomona*, *grippolyphosa*, *sejroe*, *sax-koebing*, *bataviae*, *paidjan*, *andaman*, and *hyos*.

**Results.** — The sera from 52 patients reacted positively at a dilution of  $\geq 1 : 200$ . Out of the routine samples 3.5 per cent were positive, the corresponding figure in the Widal series being 0.6 per cent. Of course, these figures do not give a true picture of the occurrence of human leptospirosis in Finland, since the clinical manifestations of leptospirosis are not as yet generally known among the practitioners. Moreover, some infections may have remained unidentified because we were not aware of the necessity of certain types in the beginning of the investigation. *E.g.*, in 1952—53, when *L. bataviae* was not yet employed, the infections with this type were identified as leptospirosis on the basis of cross-reactions and the correct diagnosis of the serotype was performed later (Cases N:o 8, 9, 10, 11, 14, 18, 20, 22, and 25 in Table 22).

The titration results obtained in the positive sera are shown in Table 22. From the samples diagnosed in 1952—53 the results obtained after 1—2 years' preservation in deep freeze are given. It seemed likely that the preservation had generally no essential influence on the antibodies, though the comparison with the freshly tested results occasionally yielded lower titers in the stored samples varying 1—3 dilutions, especially in cross-reactions.

In all cases, it was possible to determine the serogroup of the infecting leptospira, though several blood samples were often necessary for this purpose. In the first sample, the serogroup remained unclear in 13 cases, due to high cross-reactions. On the other hand, the new samples taken later revealed the serogroup as, according to the general experience, cross-reactions disappeared from the blood much more rapidly than the specific antibodies. From 7 patients, whose type diagnosis could not be made during the acute phase, samples were taken as late as 1—2 years after the onset of

TABLE 22

TITRATION RESULTS OF POSITIVELY REACTING HUMAN SERA WITH DIFFERENT LEPTOSPIRAL TYPES  
(The titers are reciprocal; the hyphen indicates that the reaction is negative at a dilution of 1 : 50)

Patient	Year	Time after Onset of Illness	Titers Obtained with Different Serotypes													Infect- ing Sero- type	
			Ict.AB	Ict.A	Jav.	Poi	Can.	Ball.	Aus.A	Pom.	Gri.	Sej.	Sax.	Bad.	Paid.		And.
1. L.K.	-52	21 days	—	—	—	—	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Can.
		31 "	—	50	—	200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		3 months	—	—	—	50	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
2. M.M.	-52	12 days	—	—	50	200	100	—	100	50	3200	1600	—	400	—	Sej.	
		32 "	—	—	—	100	50	—	50	—	6400	1600	—	200	—		
3. B.R.	-52	12 days	3200	6400	50	400	50	—	—	50	800	100	—	400	—	Ict.	
4. S. A.	-52	9 days	200	400	—	50	50	—	—	50	—	—	—	50	—	Ict.	
		21 "	200	400	—	—	—	—	—	50	—	—	—	50	—		
5. K.S.	-52	7 days	800	200	100	400	—	—	—	200	800	100	—	—	100	Ict.	
		11 "	6400	400	200	800	100	100	—	100	800	1600	200	—	200		
6. E.O.	-52	?	—	—	—	—	—	—	—	—	200	—	—	—	—	Sej.	
7. L.S.	-52	12 days	—	—	—	—	—	—	—	—	1600	800	—	200	—	Sej.	
		37 "	—	50	—	100	50	—	—	—	800	400	—	400	—		
8. R.J.	-52	6 days	200	400	100	200	200	—	—	50	800	—	400	400	—	Bad.	
		37 "	1600	1600	400	800	1600	—	400	200	1600	100	6400	3200	800	100	
9. T.H.	-52	9 days	100	400	50	100	100	—	—	—	100	200	—	400	100	Bad.	
		29 months	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	400	100	—	
10. S. L.	-52	17 days	400	800	400	800	200	—	—	400	400	800	50	1600	1600	400	50
		27 "	100	400	800	400	200	—	—	200	100	800	50	3200	1600	400	100
		28 months	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	400	200	—



Patient	Year	Time after Onset of Illness	Titers Obtained with Different Serotypes														Infecting Serotype	
			Ict. AB	Ict. A	Jav.	Poi	Can.	Ball.	Aus. A	Pom.	Gri.	Sej.	Sax.	Bat.	Paid.	And.		Hynos
25. A. J.	-53	11 days 15 months	100 —	200 —	200 —	200 —	200 —	— —	— —	400 —	200 —	3200 100	50 —	1600 400	1600 200	1600 100	400 —	Bat.
26. H. L.	-53	22 days 15 months	— —	— —	100 —	800 —	400 —	— —	— —	— —	— —	3200 400	1600 —	— —	— —	100 —	50 —	Sej.
27. A. S.	-53	28 days	50	100	400	1600	—	200	100	100	200	51200	1600	800	50	800	100	Sej.
28. E. L.	-53	23 days	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3200	100	—	—	—	—	Sej.
29. F. S.	-54	8 days	—	—	—	—	—	—	—	—	—	200	—	—	—	—	—	Sej.
30. E. P.	-54	4 months	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3200	1600	—	—	800	—	Sej.
31. I. L.	-54	?	—	—	—	—	—	—	—	—	—	200	400	—	—	—	—	Sej.
32. L. R.	-54	6 months	—	—	—	—	—	—	—	—	—	200	—	—	—	—	—	Sej.
33. L. N.	-54	26 days 59 "	—	—	—	—	—	—	—	—	—	800	400	—	—	—	—	Sej.
34. H. M.	-54	21 days 27 " 5 months	1600 1600 800	3200 3200 800	100 100 —	100 200 —	1600 1600 200	100 100 —	—	200 400 —	50 100 —	800 800 —	50 50 —	—	—	50 100	—	Ict.
35. J. T.	-54	11 days 42 " 5 months	100 1600 1600	100 1600 800	100 50 —	100 50 —	50 800 100	—	—	—	—	800 200 50	—	50 —	—	50 50	50	Ict.
36. T. R.	-54	13 days	—	—	—	400	—	—	—	—	—	3200	6400	—	—	200	100	Sej.
37. A. K.	-54	5 years?	200 200 200	400 400 400	—	—	50 50 50	50 —	—	—	—	50 50 50	50 —	—	—	50 50	50	Ict.
38. I. S.	-54	9 days	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1600	1600	—	—	200	50	Sej.
39. P. S.	-54	10 days	400	800	—	1600	800	—	—	—	—	1600	100	—	—	200	50	Can.





the illness, and the infecting serotype was identified in all of them in this way.

The average height of the maximum homologous titers was 1 : 1,600—1 : 3,200 during the first three months in the acute phase. The highest titer found, 1 : 51,200, occurred in a *L. sejroe* infection on the 28th day of the illness (Case N:o 27). In the acute phase the maximum homologous titers were as follows:

$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1,600}$	$\frac{1}{3,200}$	$\frac{1}{6,400}$	$\frac{1}{12,800}$	$\frac{1}{25,600}$	$\frac{1}{51,200}$
3	4	5	7	8	6	—	—	1 cases

Paradoxal reactions occurred in 9 cases, *i.e.*, they developed higher titers with heterologous than homologous types in first instance (Cases N:o 8, 11, 14, 15, 20, 21, 25, 35, and 39). Three patients (Cases 5, 9, and 34) developed equally high titers with heterologous and homologous serotypes. Among the aforementioned, six were infections with *L. bataviae*, five with *L. icterohaemorrhagiae*, and one with *L. canicola*. The most common types causing paradoxal reactions were *L. sejroe*, *andaman*, and *poi*.

Cross-reactions occurred frequently and irregularly with heterologous serotypes. It was a general observation, however, that in infections with *L. icterohaemorrhagiae* and *L. bataviae* there occurred at the onset of the illness frequent and high cross-reactions which were much less common in the infections with *L. sejroe*. Especially the cross-reactions with *L. andaman* were conspicuously frequent and high, but cross-reactions were often developed also with *L. sejroe* and *poi*, while they were rare with the types *L. bataviae*, *ballum*, and *australis* A. It seemed to me that the strains of *L. andaman*, *sejroe*, and *poi* used in the present study reacted more sensitively than the others. Also, Fühner (71, 72), Wolff (7), and Kmety (122) established numerous and high cross-reactions with the original *sejroe* strain M 84, while other strains, identical with *L. sejroe*, were much more monovalent. For that reason, Wolff replaced the strain Mällersdorf II for the original *sejroe* strain in the routine work some years ago. It is obvious that the cross-reactions with *L. sejroe* established in this study are also due to the strain M 84, but are not characteristic of the *sejroe* serotype as a whole.

The exact determination of the serotype was generally impossible by means of serological antibody examinations. The slight variations



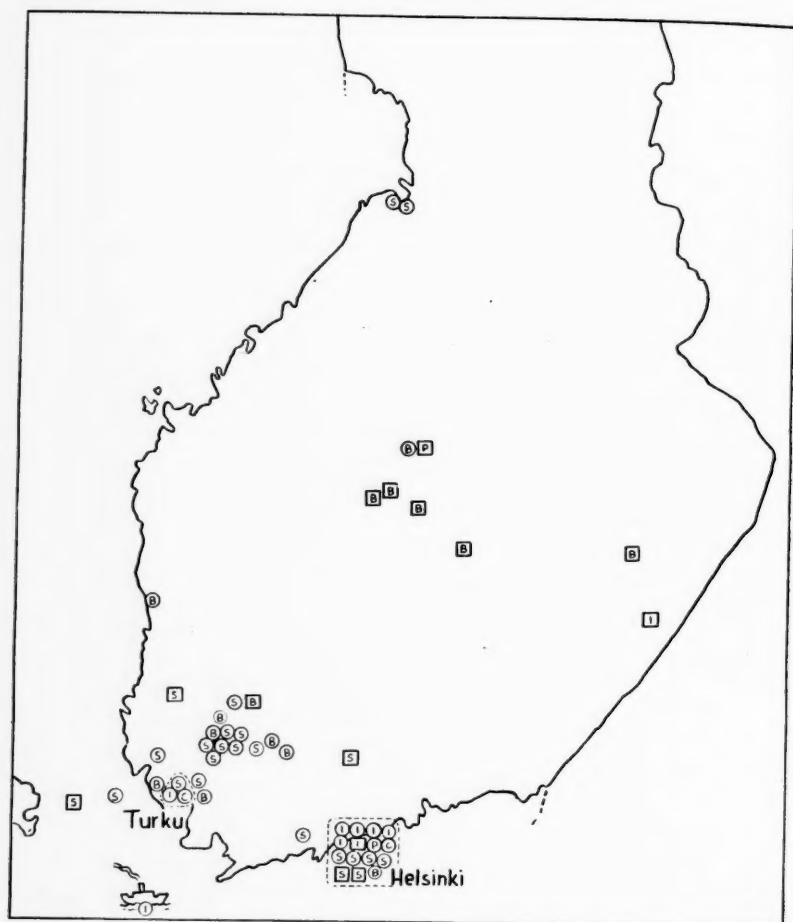
of 1—2 dilutions found in the most cases gave, in my opinion, no reason for drawing conclusions with regard to the serotype because of varying sensitiveness of the strains. On the other hand, the confirmation of the serotype was justified in the cases with greater titer variations (Cases N:o 5, 27, 28) or when the positive result was obtained with one serotype only (Cases N:o 6, 12, 13, 26, 29, 32, 45, 49, 50, 51). On the basis of this, it appears that 10 cases were caused by the serotype of *L. sejroe* and one case by the serotypes of *L. ict.* AB, *ict.* A, and *poi*. No absorption tests were performed on human sera.

The following numbers of different serogroups were encountered in the human series:

Serogroups	Number of Cases	Per Cent
<i>L. sejroe</i> .....	24	46
<i>L. bataviae</i> .....	15	29
<i>L. icterohaemorrhagiae</i> .....	9	17
<i>L. canicola</i> .....	2	4
<i>L. poi</i> .....	2	4
In Total		52 Cases

It was obvious on the basis of the typical clinical picture and the antibody determinations that 34 patients suffered from acute leptospiral infections. Moreover, 6 patients had a febrile illness, which may have been caused by leptospirae. In these groups, seven patients showed symptoms of serous meningitis. As a late complication of leptospirosis, uveitis occurred probably in five cases. No evidence of present leptospirosis was found in eight patients, whose blood samples contained leptospiral antibodies in the titers of 1:200—1:1,600, and the positive titer in these cases obviously was a rest from an earlier passed infection. The patients are grouped in Table 23 according to the clinical picture. The more detailed description of the clinical manifestations is not within the scope of the present paper. The cases of acute benign leptospirosis will be published with Dr. I. Ruikka (191) and those of leptospiral uveitis with Dr. A. Oksala (164).

The geographical distribution of the cases is shown in Fig. 3. The picture presented by the map is far from complete, since varying numbers of samples were sent from different parts of the country. The conclusion may be drawn, however, that leptospirosis



## Declaration:

I	II	
(S)	[S]	A case of <i>L. sejroe</i>
(B)	[B]	» » » <i>L. bataviae</i>
(I)	[I]	» » » <i>L. icterohaemorrhagiae</i>
(C)	[C]	» » » <i>L. canicola</i>
(P)	[P]	» » » <i>L. poi</i>

I = Acute cases

II = Cases of leptospiral uveitis or earlier passed infections

Fig. 3. — Geographical Distribution of Human Cases.

TABLE 23  
DISTRIBUTION OF HUMAN INFECTIONS ACCORDING TO CLINICAL PICTURE

Clinical Picture	Number	Figures of Cases
Evident cases of acute febrile leptospiriosis .....	34	2, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 32, 33, 34, 35, 36, 38, 39, 40, 41, 50
Probable cases of acute febrile leptospiriosis .....	5	1, 4, 12, 13, 49
In above groups, cases showing symptoms of serous meningitis .....	7	3, 4, 13, 14, 33, 36, 40
Cases of leptospiral uveitis .....	5	30, 43, 44, 46, 47
Obviously earlier passed infections ....	8	6, 31, 37, 42, 45, 48, 51, 52

occurs sporadically here and there all over the inhabited Finland. Besides this, a real epidemic of leptospiriosis with *L. sejroe* and *L. bataviae* broke out in South-Western Finland in the fall of 1953—54, though, according to our information, only a minority of the cases was verified serologically.

#### CONCLUSIONS

1. The most common leptospiral types causing human infections in Finland seemed to be *L. sejroe* and *L. bataviae*. In addition, infections with *L. icterohaemorrhagiae*, *canicola*, and *poi* were found in man.

2. The average height of the maximum homologous titers was 1:1,600—1:3,200 during the first three months after the onset of the illness, though also lower and higher titers occurred frequently.

3. Cross-reactions with heterologous types were common in the infections caused by *L. icterohaemorrhagiae* and *L. bataviae*, being less frequent in the infections with *L. sejroe*. The strains of *L. andaman*, *sejroe*, and *poi* developed most cross-reactions.

4. The serogroup of the infecting leptospira could be determined in all cases by means of serological examinations. In some cases, however, the type determination could not be performed until after the examination of several samples, due to paradoxal and cross-reactions.

## DISCUSSION

On the basis of the present investigation of small mammals, it is obvious that *Rattus norvegicus* is the main carrier of *L. icterohaemorrhagiae*, *Mus musculus* that of *L. sejroe*, and *Micromys minutus* that of *L. bataviae* in Finland. *Mus musculus* is the same race which Borg-Petersen showed to be the carrier of *L. sejroe* in Denmark and which he called *Mus (musculus) spicilegus*. *Micromys minutus* is equally the same species which Mino found to be the carrier of *L. bataviae* in the rice fields of Northern Italy, though possible racial differences between the Finnish and Italian harvest mouse have not as yet been studied. Similar results obtained in Denmark, Italy, and Finland suggest that *Mus musculus* and *Micromys minutus* were of considerable significance as carriers of *L. sejroe* and *L. bataviae*.

Contrary to the studies performed elsewhere, strains of *L. sejroe* and *L. bataviae* could be also isolated from *Microtus arvalis* and *Microtus agrestis* in the fields of the Viik Educational and Experimental Farm, Malmi. Besides the common and field voles, the same fields were rich in house mice and harvest mice; infections with *L. sejroe* were found in the former and those with *L. bataviae* in the latter. It is possible, indeed, that the voles had been contaminated through the mice so that these might have been occasional infections. Not a single strain of *L. grippotyphosa* could be cultivated from the kidneys of *Microtus arvalis*, though in Central Europe *Microtus arvalis* has often been infected with this type.

The fourth type cultivated from the small mammals was identical with *L. poi*. The information in the literature on the occurrence of this type is very scanty. Some cases were diagnosed among human leptospirosis in Italy and Denmark, but no knowledge of the sources of infection was obtained. The isolated strains of *L. poi* in the present study were cultivated from an *Apodemus flavicollis* and a *Sorex araneus*, while the 82 other common shrews were negative. Some strains of a possibly new type, *L. sorex*, were isolated from *Sorex araneus* by Varfolomeyeva in the USSR and by Kmety in

Czechoslovakia. On the basis of the serological examinations, *e.g.*, the affinity with *L. icterohaemorrhagiae*, it is possible that *L. sorex* may be identical with *L. poi*. In this case *Sorex araneus* could be the primary carrier of *L. poi*.

It is a generally agreed opinion of the epidemiology of leptospirosis that leptospirosis is primarily a disease of small mammals and domestic animals and that human infections always occur through close contact with these animals. On the contrary, Kathe (109, 110, 111) considers leptospirosis a primary soil infection, and is of the opinion that pathogenic leptospirae live constantly in waters wherefrom the small mammals, domestic animals, and man are infected. Kathe based his theory on the fact that large epidemics of leptospirosis in Central Europe broke out in rainy falls, while in dry years only sporadic cases occurred in spite of the great incidence of infected mice. In my opinion, rain and moisture might promote the transmission from mice to man. In rainy seasons the infected mice contaminate the waters with leptospirae and, though pathogenic leptospirae are extremely sensitive microorganisms, they may in suitable circumstances remain alive and virulent at least for several weeks according to the experiments performed.

The rate of infection in mice is not constant, but varies to a considerable extent in various places and seasons. According to Kmety (121), the rate of infection among small mammals is hardly 1 per cent in times when there are no epizootics of rodents, increasing until 40 per cent during epizootics when human infections may also occur. This seems to be a right assumption also in our experience, but an improved knowledge of the ways of infection among mice is needed. I am willing to agree with the opinion that leptospirosis is, as a rule, a venereal disease among small mammals; it would otherwise be difficult to understand the host specificity of leptospiral types. There also occur extragenital infections through the urine and waters containing pathogenic leptospirae, when the serotypes may be transferred from the carrier to other species of small mammals.

Though the results obtained from the small mammals in Northern Finland were negative, the conclusion cannot be drawn that the micromammals in Lapland would be free from leptospirae. Perhaps no epizootics occurred in mice during the period of examination and the rare leptospiral carriers did not belong to the individuals tested. An epidemic in the troops in Salla in 1942 reported by Stuhl-

fauth (220) and Hortling (94) is of great interest in this connexion. It resembled leptospirosis both clinically and epidemiologically, *e.g.*, there was no evidence of man-to-man infection and the disease was in close contact with a very rich incidence of mice, voles, and lemmings. Since 1934, Zetterholm (258), Myhrman (151, 152, 153, 154), and others (88, 133, 150, 56) have reported on a febrile illness with renal symptoms in Scandinavia called «*Nephropathia epidemica*», the clinical symptoms and epidemiology of which are likewise similar to benign leptospirosis. However, the antibody examinations of these patients with the types *L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. sejroe*, and *L. bataviae* yielded negative results (154). *Nephropathia epidemica* might be a leptospirosis caused by a so far unknown leptospiral type occurring in the rich murine population in Lapland. As another etiological possibility, a rickettsiosis resembling hemorrhagic fevers and transmitted by the insects from the rodents must be taken into consideration. Such a disease has been reported from the USSR and Korea (76).

Endemically occurring leptospiral types in domestic animals in Finland were found in the serological investigations, *viz.*, *L. icterohaemorrhagiae* and *L. canicola* in dogs and *L. pomona* and *L. hyos* in swine. No evidence of endemic leptospirosis could be found among the cattle. It is generally agreed that the transmission in the infections of domestic animals with these types takes place without any carrier in small mammals, directly from animal to animal, and the infected animals remain chronic renal carriers. Dogs may, however, catch the infection with *L. icterohaemorrhagiae* also from rats, though this seems to be less frequent.

In addition to the afore-mentioned types, antibodies were found frequently in domestic animals against the serotypes occurring in small mammals, *viz.*, *L. bataviae* (30 titers), *L. poi* (21 titers), *L. sejroe* (20 titers), and *L. icterohaemorrhagiae* (15 titers). I am of the opinion that domestic animals are contaminated in these cases through small mammals and the infection does not generally spread from one domestic animal to another. The problem needs, however, further investigation. Besides the antibody examinations, systematic renal cultivations should be carried out from the slaughtered animals in order to know whether domestic animals remain leptospiral carriers for longer periods of time also in infections with the murine types. It was surprising to note that leptospiral antibodies

were 10 times more common in the sera of horses (32.6 per cent) than in those of cattle (3.0 per cent), though we could not give any explanation to this finding. The difference in the rate of infection may be but occasional being due to the fact that the examined horses were brought mainly from areas contaminated by leptospirae, while the cattle were mainly from places free from leptospirosis.

In human sera antibodies were ascertained against all leptospiral types found in small mammals. The most common types causing human infections in Finland seemed to be *L. sejroe* and *L. bataviae*. The clinical picture of these types was rather mild as compared with that produced by *L. icterohaemorrhagiae*: acute febrile illness of about 7 days' duration, muscular pains, mild renal symptoms, and often without icterus. None of the cases was fatal. The infections with *L. icterohaemorrhagiae* were distinctly less frequent than those with *L. sejroe* or *L. bataviae*. The human infections with *L. poi* seemed to be rare, though the antibodies of *L. poi* in the domestic animals were as frequent as those of the other types.

At least two cases of *L. canicola* were found among the human leptospirosis transmitted from domestic animals. On the other hand, the porcine types, *L. pomona* and *L. hyos*, were not established. As these types are common in the swine in Finland, human infections among men being in close contact with swine are to be expected, as the Swiss investigations have previously shown.

*L. grippityphosa*, common as a causative microbe of field fever in Central Europe, was not found in the micromammals, domestic animals, or men in the present study. However, two cases of this infection were previously published in Finland. The case published by Kalaja (106) in 1947 was examined with only *L. icterohaemorrhagiae* and *L. grippityphosa* serotypes, when the titer of 1:100 developed by the latter might have been a cross-reaction. The other infection with *L. grippityphosa*, published by Koulumies and Salminen (129) occurred in a South African visitor during the Olympic Games in 1952. He had obviously caught the infection in Central Europe or on board. Thus, the *L. grippityphosa* type has not as yet been identified with certainty in Finland. However, its appearance may be expected, as its carrier, *Microtus arvalis*, has spread over Southern and Central Finland in recent years. At present the com-



mon vole seems to be free from the leptospirae of *L. grippotyphosa* in Finland.

In the series published by Koulumies and Salminen (129), five out of 33 patients with leptospirosis developed the highest titer with *L. andaman* A. I was not able to cultivate this type from the small mammals or identify it serologically as a cause of human infection in the present study. On the other hand, frequent and high paradoxal and cross-reactions were encountered with *L. andaman*. In my opinion, there was probably a cross-reaction in the cases diagnosed as infections with *L. andaman* A by Koulumies and Salminen, the specific serotype being not included in the test. The actual infecting type might have been, *e.g.*, *L. bataviae*.



## SUMMARY

The purpose of the present study was to throw light on the leptospiral types, their occurrence, and sources of infection in Finland. The study was divided into three parts: 1) The cultivation of leptospirae from the kidneys of small mammals and the serological identification of the isolated strains. 2) The investigation of leptospiral antibodies in the sera of domestic animals, *i.e.*, of dogs, swine, cattle, and horses, by means of the agglutination lysis test. 3) The serological examination of leptospiral antibodies in the patients suspected of leptospirosis with special attempt to determine the infecting leptospiral type.

1. Among small mammals, 505 animals were studied the series including almost all species of small rodents and shrews occurring in Finland. In total, 81 leptospiral strains were cultivated from their kidneys.

Sixty-two strains were isolated from 100 *Rattus norvegicus* tested, all of the strains belonging to the serogroup of *L. icterohaemorrhagiae*. Thirty-two strains of them were of the biotype *L. ict.* AB and 30 of *L. ict.* A. The rate of infection in rats ranged between 20—70 per cent at various places of capture, the promoting factor being probably the increasing density of the rat population.

Six strains of *L. sejroe* were cultivated from the kidneys of 26 *Mus musculus* examined. *Mus musculus* proved to be the main carrier of *L. sejroe* in Finland.

From 44 *Micromys minutus* investigated, four strains of *L. bataviae* could be isolated. It became obvious that *Micromys minutus* is the main carrier of *L. bataviae* in Finland.

In total, three strains of *L. sejroe* and four strains of *L. bataviae* were cultivated from *Microtus arvalis* and *Microtus agrestis*. It was

assumed that these were occasional infections from house and harvest mice living in the same fields. Not a single strain of *L. grippotyphosa* could be isolated from *Microtus arvalis*, though it is the carrier of *L. grippotyphosa* in Central Europe.

One strain of *L. poi* was isolated from both *Apodemus flavicollis* and *Sorex araneus*. The number of the shrews investigated was 101, but other leptospiral carriers could not be found among them.

It was impossible to cultivate leptospirae from the kidneys of 138 voles belonging to the genus *Clethrionomys*. Leptospirae could not be demonstrated in the 172 animals tested in Lapland, either.

2. The sera of 841 domestic animals were investigated for leptospiral antibodies with 8 leptospiral serotypes at a dilution of 1 : 50, and the titers were determined in positively reacting cases. The sera of swine, cattle, and horses were collected at the slaughterhouse.

From the 37 canine sera tested, antibodies were ascertained in 18.9 per cent. The infecting serotypes were *L. icterohaemorrhagiae* in 4 cases, *L. bataviae* in 2 cases, and *L. canicola* in one case.

Out of the 406 porcine sera, antibodies were found in 16.5 per cent. Eleven of the positive sera developed titers simultaneously with 2—4 leptospiral types, while the others gave reactions with one type only. The numbers of the titers for different serotypes were *L. hyos* 43, *L. bataviae* 11, *L. poi* 9, *L. pomona* 6, *L. sejroe* 6, and *L. icterohaemorrhagiae* 5.

Antibodies were established only in 3.0 per cent of the 303 bovine sera tested. The infecting serotypes were *L. sejroe* in 5, *L. poi* in 2, and *L. bataviae* in 2 cases.

From the 95 equine sera investigated, antibodies were found in 32.6 per cent. Nine sera of them reacted simultaneously with 2—4 leptospiral types. The numbers of the titers for different serotypes were *L. bataviae* 15, *L. poi* 10, *L. sejroe* 9, *L. icterohaemorrhagiae* 5, and *L. hyos* 4.

Endemically occurring leptospiral types in domestic animals in Finland were ascertained to be *L. icterohaemorrhagiae* and *L. canicola* in dogs, and *L. pomona* and *L. hyos* in swine, but no evidence of endemic leptospirosis could be found among the cattle. It was supposed that the infections with other leptospiral types in domestic animals are mainly transmitted from small mammals.

3. The number of the human sera tested was 2311, of which the samples from 52 patients reacted positively at a dilution of  $\geq 1:200$ . It was possible to determine the serogroup of the infecting leptospira in all the cases, though several blood samples were often necessary for this purpose due to paradoxal and cross-reactions.

The various types in the human series were as follows: *L. sejroe* in 24 cases, *L. bataviae* in 15 cases, *L. icterohaemorrhagiae* in 9 cases, *L. canicola* in 2 cases, and *L. poi* in 2 cases.

The average height of the maximum homologous titers was 1:1,600—1:3,200 during the first three months after the onset of the illness. Cross-reactions with heterologous types were common especially in the infections of *L. icterohaemorrhagiae* and *L. bataviae*. The type strains of *L. andaman*, *sejroe*, and *poi* developed most paradoxal and cross-reactions.

According to the clinical picture, it was obvious that 34 were evident and 5 probable cases of acute febrile leptospirosis. Moreover, five patients suffered from uveitis, and in 8 cases the antibody titer was obviously a rest from an earlier passed leptospiral infection.

On the basis of the present study at least the following seven leptospiral serotypes were found in Finland, whose principal carrier hosts proved to be the following animals:

	Carrier
<i>Leptospira icterohaemorrhagiae</i>	<i>Rattus norvegicus</i> , Dog
<i>Leptospira poi</i>	<i>Sorex araneus</i> ?
<i>Leptospira canicola</i>	Dog
<i>Leptospira pomona</i>	Swine
<i>Leptospira sejroe</i>	<i>Mus musculus</i>
<i>Leptospira bataviae</i>	<i>Micromys minutus</i>
<i>Leptospira hyos</i>	Swine

## LITERATURE

### MONOGRAPHS ON LEPTOSPIRAE AND LEPTOSPIROSIS

1. AUSTONI, M.: *Le Leptospirosi*, Tipografia del Seminario, Padova 1953.
2. GSELL, O.: *Leptospirosen*, Hans Huber, Bern 1952.
3. KIKTÉNKO, V. S.: *Leptospirózy chelovéka*, Medgiz, Moskva 1954.
4. RIMPAU, W.: *Die Leptospirose*, Urban-Schwarzenberg, München/Berlin 1950.
5. THIEL, P. H., VAN: *The Leptospiroses*, University Press, Leiden 1948.
6. VARFOLOMÉYEVA, A. A.: *Leptospirózníye zabolevániya chelovéka*, Medgiz, Moskva 1949.
7. WOLFF, J. W.: *The Laboratory Diagnosis of Leptospirosis*, Thomas, Springfield, Illinois, U.S.A. 1954.

### OTHER REFERENCES\*

8. AALVIK, T.: *Nord. Med.* 1946:30:749.
9. ANÁNYIN, V. V.: *Zool. Zh.* 1951:375. Cited by KMETY (120).
10. ANÁNYIN, V. V., and KARASEVA, E. V.: *Zh. Mikrobiol.* 1953:4:64. Cited by KMETY (122).
11. AVRÓROV, A. A., and SEMSKÓV, M. V.: *Veterinarija* 1937: No. 7. Cited by SEMSKOV (209).
12. AZEVEDO, J. F.: *An. Inst. Med. trop. (Lisboa)* 1943:1:13.
13. BABUDIERI, B.: *Verh. dtsh. Ges. inn. Med.* 1940:52. Kongress:126.
14. BABUDIERI, B.: *Z. ImmunForsch.* 1941:99:442.
15. BABUDIERI, B.: *R. C. Ist. sup. Sanità* 1949:12:937. Cited by GSELL (2) p. 170.
16. BABUDIERI, B.: *R. C. Ist. sup. Sanità* 1951:14:530. Abstract in *Bull. Hyg. (Lond.)* 1952:27:429.
17. BABUDIERI, B.: WHO/FAO Seminar on Zoonoses, Vienna 1952:p.118.
18. BABUDIERI, B., and AUSTONI, M.: *Schweiz. Z. allg. Path. Bakt.* 1953:16:514.
19. BABUDIERI, B., and BIANCHI, L.: *Z. ImmunForsch.* 1940:98:37.
20. BABUDIERI, B., and CASTAGNOLI, B.: *Ann. Igiene* 1940:50:145.
21. BAERMANN, G.: *Geneesk. T. Ned.-Ind.* 1923:63:885.
22. BERNKOPF, H.: *Report on Bovine Leptospirosis in Palestine*, Jerusalem 1948.
23. BERNKOPF, H., and OLITZKI, L.: *Report of the Palestine Board for Scientific and Industrial Research* 1948:20.

\* Abbreviations according to "World Medical Periodicals", WHO/UNESCO, Paris 1953.

24. BERNKOPF, H., OLITZKI, L., and STUCZYNSKI, L. A.: *J. infect. Dis.* 1947:80:53.
25. BERNKOPF, H., OLITZKI, L., STUCZYNSKI, L. A., GOTLIEB, T., and HALEVI, C.: *J. infect. Dis.* 1948:83:232.
26. BESSEMAN, A., and NELIS, P.: *C. R. Soc. Biol. (Paris)* 1928:98:1234.
27. BLOMBERG, H.: *Finska LäkSällsk. Handl.* 1936:79:1062.
28. BLOMENBERG, W.: *Ergebn. Hyg. Bakt.* 1939:22:168.
29. BLOOM, F.: *Symposium on the Leptospiroses*, U. S. Government Printing Office, Washington 1953: p. 118.
30. BOHL, E. H., and FERGUSON, L. C.: *J. Amer. vet. med. Ass.* 1952:121:421.
31. BORG, L. O.: *Skr. norske Vidensk.-Akad., I. Mat.-nat. Kl.* 1941:2:1.
32. BORG, L. O.: *Nord. Med.* 1946:32:2359.
33. BORG, L. O., and THJØTTA, TH.: *Skr. norske Vidensk.-Akad., I. Mat.-nat. Kl.* 1941:1:1.
34. BORG-PETERSEN, C.: *Acta conventus Tertii de Tropicis Morbis* 1938: I:396. Also in *Communications de l'Institut Sérotherapique de l'Etat Danois* 1940:30.
35. BORG-PETERSEN, C.: *Acta path. microbiol. scand.* 1944:21:165.
36. BORG-PETERSEN, C.: *Acta path. microbiol. scand.* 1944:21:504.
37. BORG-PETERSEN, C.: *Proc. roy. Soc. Med.* 1949:42:714.
38. BORG-PETERSEN, C., and FAGRAEUS, A.: *Acta path. microbiol. scand.* 1949:26:555.
39. BORG-PETERSEN, C., and INGEMANN-CRISTENSEN, H.: *Ugeskr. Laeg.* 1939:101:697. Also in *C. R. Soc. Biol. (Paris)* 1939:130:1507.
40. BORST, J. G. G., RUYS, A. CH., and WOLFF, J. W.: *Ned. T. Geneesk.* 1948:92:2920.
41. BOYER, M. E.: *J. Amer. vet. med. Ass.* 1952:121:184.
42. BROOM, J. C.: 67th Annual Congress of National Veterinary Medical Association of Great Britain and Ireland, London 1949: p. 1.
43. BROOM, J. C.: *Brit. med. J.* 1951:II:689.
44. BROOM, J. C., and ALSTON, J. M.: *Lancet* 1948:II:96.
45. BURNSTEIN, T., and BAKER, J. A.: *J. infect. Dis.* 1954:94:53.
46. CAMPBELL, A. M. G., MACRAE, J., MANDERSON, W. G., SUMNER, K. C., and BROOM, J. C.: *Brit. med. J.* 1950:I:336.
47. CARLINFANTI, E.: *Z. Immunforsch.* 1938:94:426.
48. CARLINFANTI, E.: *Z. Immunforsch.* 1941:99:460.
49. CATCHPOLE, A.: *Vet. Rec.* 1934:46:376.
50. CHANG, R. S., and McCOMB, D. E.: *Amer. J. trop. Med.* 1954:3:481.
51. CHEMNITZ, H.: *Z. Immunforsch.* 1953:110:395.
52. CLAYTON, G. E. B., DERRICK, E. H., and CILENTO, R. W.: *Med. J. Aust.* 1937:24:647.
53. COLLIER, W. A.: *Schweiz. med. Wschr.* 1948:78:508.
54. COLLIER, W. A., and ESSEVELD, H.: *Meded. Dienst. Volks-gezondh. Ned.-Ind.* 1938:27:262.
55. COLLIER, W. A., and MOCHTAR, A.: *Geneesk. T. Ned.-Ind.* 1939:79:226.

56. CÖSTER, C., and LUBLIN, H.: *Acta med. scand.* 1950:138:Suppl.246:p.46.
57. COVALEDA, J., PUMAROLA, A., and CANTARELL, I.: *Rev. ib. Parasit.* 1955:13:289. Abstract in *Bull. Hyg. (Lond.)* 1955:30:412.
58. DINGER, J. E.: *Geneesk. T. Ned.-Ind.* 1932:72:1511.
59. DINGER, J. E.: *Geneesk. T. Ned.-Ind.* 1933:73:402.
60. ELTON, CH.: *Voles, Mice, and Lemmings, Problems in Population Dynamics*, Clarendon Press, Oxford 1942.
61. ELTON, CH., FORD, E. B., BAKER, J. R., and GARDNER, H. D.: *Proc. Zool. Soc. London* 1931:III:657.
62. ESSEVELD, H.: *Proceedings of the 4th International Congresses on Tropical Medicine and Malaria*, Washington 1948:I:314.
63. ESSEVELD, H., and COLLIER, W. A.: *Z. Immunforsch.* 1938:93:512.
64. ESSEVELD, H., and MOCHTAR, A.: *Geneesk. T. Ned.-Ind.* 1938:78:1513.
65. EZELL, S. B., HOAG, W. G., WARNER, A. R., YAGER, R. H., and GOUCHENOUR, W. S. Jr.: *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 1952:80:220.
66. FAINE, S., and KIRSCHNER, L.: *N. Z. med. J.* 1953:52:12.
67. FERGUSON, L. C., and BOHL, E. H.: *Veterinary Science News (University of Wisconsin)* 1951:5:6.
68. FIELDING, J. W.: *Laboratory Journal of Australasia* 1941. Ref. by Wolff (7).
69. FREUND, S.: *Veterinary Medicine (Palestine)* 1944:9. Ref. by BERNKOPF, OLITZKI, and STUCZYNSKI (24).
70. FREUND, S., TRAININ, D., and MALKIN, M.: *Palestine Veterinary Bulletin* 1941:153. Cited by BERNKOPF, OLITZKI, and STUCZYNSKI (24).
71. FÜHNER, F.: *Z. Immunforsch.* 1950:108:278.
72. FÜHNER, F.: *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* 1951:157:103.
73. GAEHTGENS, W.: *Klin. Wschr.* 1933:12:697.
74. GAEHTGENS, W.: *Z. Immunforsch.* 1939:96:287.
75. GAEHTGENS, W.: *Z. Immunforsch.* 1950:107:96.
76. GAJDUSEK, D. C.: *Acute Infectious Hemorrhagic Fevers and Mycotoxicoses in the Union of Soviet Socialist Republics*, U. S. Government Printing Office, Washington 1953.
77. GARDNER, A. D., and WYLIE, J. A. H.: *Lancet* 1946:I:955.
78. GISPEN, R., and SCHÜFFNER, W.: *Acta brev. neerl. Physiol.* 1939:9:184.
79. GISPEN, R., and SCHÜFFNER, W.: *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* 1939:144:427.
80. GOUCHENOUR, W. S. Jr., YAGER, R. H., and WETMORE, P. W.: *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 1950:74:199.
81. GREENE, M. R.: *J. Bact.* 1945:50:39.
82. GREENE, M. R., CAMIEN, M. N., and DUNN, M. S.: *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 1950:75:208.
83. GSELL, O.: *Bull. schweiz. Akad. med. Wiss.* 1944:I:67.
84. GSELL, O.: *Schweiz. med. Wschr.* 1946:76:237.
85. GSELL, O.: *Symposium on the Leptospiroses*, U.S. Government Printing Office, Washington 1953: p. 34.
86. GSELL, O.: *Klin. Wschr.* 1954:32:604.

87. GSELL, O., and WIESMANN, E.: Schweiz. med. Wschr. 1948:78:503.
88. HÄLLQVIST, B.: Svenska LäkT. 1949:46:985.
89. HEUSSER, H.: Schweiz. Arch. Tierheilk. 1948:40:287.
90. HEUSSER, H., GSELL, O., KANTER, U., and WIESMANN, E.: Schweiz. med. Wschr. 1948:78:756.
91. HOAG, W. G., GOUCHENOUR, W. S., and YAGER, R. H.: Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 1953:83:490.
92. HOEDEN, J., VAN DER: Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg. 1953:47:364.
93. HORNE-JENSEN, B.: Maanedsskr. Dyrlæg. 1938:50:177, 204.
94. HORTLING, H.: Sotilaslääketieteellinen aikakauslehti 1944:19:8. Also in Nord. Med. 1946:30:1001 and Finska LäkSällsk. Handl. 1946:89.
95. HÜBENER, H., and REITER, H.: Dtsch. med. Wschr. 1915:41:1275 and 1916:42:1, 131.
96. HÜBENER, H., and REITER, H.: Z. Hyg. InfektKr. 1916:81:171.
97. IDO, Y., HOKI, R., ITO, H., and WANI, H.: J. exp. Med. 1917:26:341.
98. IDO, Y., ITO, H., and WANI, H.: J. exp. Med. 1918:28:435.
99. INADA, R., IDO, Y., HOKI, R., KANEKO, R., and ITO, H.: J. exp. Med. 1916:24:377.
100. INADA, R., KANEKO, R., HOKI, R., ITO, H., WANI, H., and OKUDA, K.: Korrespondenz-Blatt für Schweizer Ärzte 1916:46:993.
101. JIROVEC, O., and STOLCOVA-SUTORISOVA, M.: Schweiz. Z. allg. Path. Bakt. 1947:10:30.
102. JOHNSON, D. W.: Med. J. Aust. 1942:29:431.
103. JOHNSON, D. W.: Brit. med. J. 1943:II:659.
104. JOHNSON, D. W.: Med. J. Aust. 1950:37:724.
105. JOSHUA, J. O.: 67th Annual Congress of National Veterinary Medical Association of Great Britain and Ireland, London 1949: p. 4.
106. KALAJA, T.: Duodecim (Helsinki) 1947:63:744.
107. KALELA, O.: Ann. Zool. Soc. »Vanamo» (Helsinki) 1949:13:No.5.
108. KALELA, O.: Ann. Zool. Soc. »Vanamo» (Helsinki) 1951:14:No.5.
109. KATHE, J.: Ergebn. Hyg. Bakt. 1941:24:159.
110. KATHE, J.: Z. ImmunForsch. 1943:103:60.
111. KATHE, J.: Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 1950:155:199.
112. KATHE, J., ENGELHARDT, K., and GREVE, O.: Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 1952:158:333.
113. KINDLER, M., and SCHINDLER, R.: Mh. prakt. Tierheilk. 1950:2:14.
114. KIRSCHNER, L.: N. Z. med. J. 1954:53:119.
115. KIRSCHNER, L., MILLER, T. F., and GARLICK, C. H.: N. Z. med. J. 1952:51:98.
116. KIVIRIKKO, K. E.: Suomen selkärankaiset, WSOY, Porvoo 1940.
117. KLARENBECK, A.: Ann. Inst. Pasteur 1927:41:1156.
118. KLARENBECK, A., and SCHÜFFNER, W.: Ned. T. Geneesk. 1933:77:4271.
119. KLETT, H.: Dtsch. tierärztl. Wschr. 1899:7:41, 49, 57, 68.
120. KMETY, E.: Čsl. hygiena epidemiol. mikrobiol. 1954:3:41.
121. KMETY, E.: Vorlesung auf der Konferenz über natürliche Seuchenherde in Bratislava, November 1954.



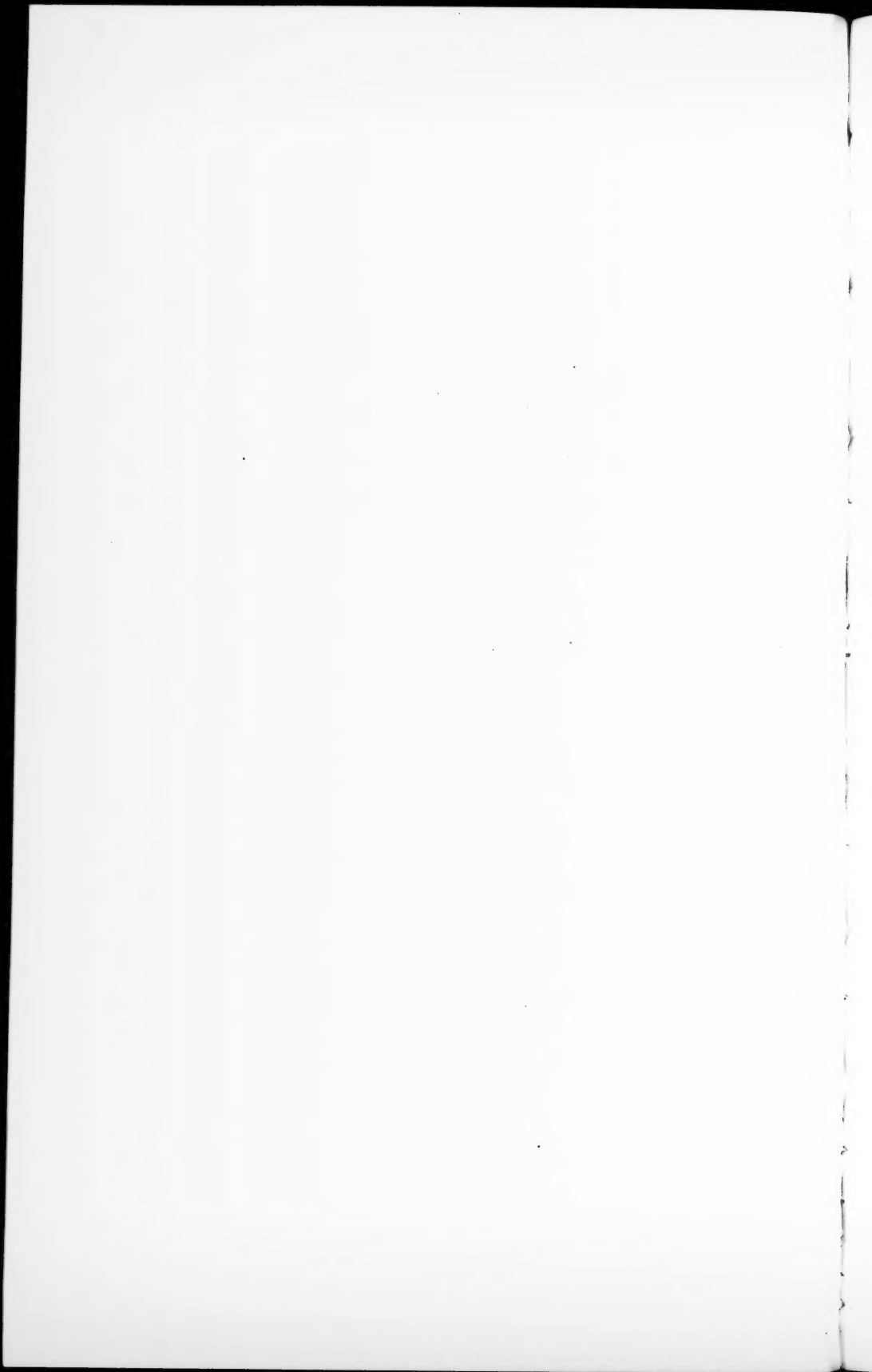
122. KMETY, E.: Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 1954:161:382.
123. KMETY, E.: Bratislavské lekárs. Listy 1955:35:261.
124. KMETY, E.: Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 1955:163:398.
125. KOLOCHINE-ERBER, B., and COLLOMBIER, M.: Ann. Inst. Pasteur 1950:79:370.
126. KORTHOF, G.: Versl. Volksgezondh. 1928:1272.
127. KORTHOF, G.: Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 1932:125:429.
128. KORVENKONTIO, V. A.: Luonnon Ystävä (Helsinki) 1921:25:69.
129. KOULUMIES, R., and SALMINEN, A.: Ann. Med. intern. Fenn. 1953:42: Suppl.16.
130. LANGE, K., and BORGES, L. O.: T. norske Laegeforen. 1946:66:187.
131. LARSON, C. L.: Publ. Hlth Rep. (Wash.) 1944:59:522.
132. LINDEN, K. E.: Finska LäkSällsk. Handl. 1894:36:32.
133. LUBLIN, H.: Svenska LäkT. 1949:46:1166.
134. LUMLEY, G. F.: Med. J. Aust. 1937:24:654.
135. MALMGREN, B.: Acta path. microbiol. scand. 1941:Suppl.43.
136. MCINTYRE, W. I. M., and SEILER, H. E.: J. Hyg. 1953:51:330.
137. MISHIN, N. A., and AZINOV, S. A.: Veterinarija 1935:No.10:23. Abstract in Vet. Bull. (Weybridge) 1937:7:419.
138. MIESSNER, H., and DEDIÉ, K.: Dtsch. tierärztl. Wschr. 1937:45:809.
139. MIHALJEVIC, F., and FALISEVAC, J.: J. med. Bibl. (Zagreb) 1952: No.85. Cited by GSELL (85).
140. MINO, P.: Acta conventus Tertii de Tropicis Morbis, Amsterdam 1938:I:422.
141. MINO, P.: Z. ImmunForsch. 1939:96:466.
142. MINO, P.: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 1940:52.Kongress:111.
143. MINO, P.: Münch. med Wschr. 1941:88:96.
144. MINO, P.: Klin. Wschr. 1942:21:337.
145. MOCHTAR, A.: Geneesk. T. Ned.-Ind. 1941:81:2670.
146. MOCHTAR, A., and COLLIER, W. A.: Ned.-Ind. Bl. Diergeneesk. 1939: 51:339.
147. MOCHTAR, A., and COLLIER, W. A.: Schweiz. Z. allg. Path. Bakt. 1939: 2:319.
148. MOHR, E.: Die freilebenden Nagetiere Deutschlands, Gustav Fischer, Jena 1954.
149. MÜLLER, F.: Münch. med. Wschr. 1894:41:773.
150. MURI, J.: Nord. Med. 1950:43:290.
151. MYHRMAN, G.: Nord. med. T. 1934:7:793.
152. MYHRMAN, G.: Nord. Med. 1945:28:2571.
153. MYHRMAN, G.: Nord. Med. 1948:40:1770.
154. MYHRMAN, G.: Acta med. scand. 1951:140:52.
155. NEFÉDYEV, A. J.: Veterinarija 1949:26:25. Abstract in Vet. Bull. (Weybridge) 1951:21:138.
156. NEWMAN, J. P.: Amer. J. vet. Res. 1950:11:405.
157. NIEMI, T.: Duodecim (Helsinki) 1937:53:112.
158. NIKOLSKIY, S. N., DESYÁTOV, F. M., and MARCHÉNKO, J. F.: Veterinarija 1935:No.10. Cited by SEMSKOV (209).



159. NOGUCHI, H.: J. exp. Med. 1918:27:575.
160. NOGUCHI, H.: J. exp. Med. 1918:27:593.
161. NOGUCHI, H.: J. exp. Med. 1920:31:125.
162. NORDSTRÖM, G.: Nord. Med. 1941:10:1583.
163. NØRGAARD, J., and BORG-PETERSEN, C.: Maanedsskr. Dyrlaeg. 1938: 50:127.
164. OKSALA, A., and SALMINEN, A.: Acta ophthal. (Kbh.) 1956:34:1.
165. OLEJNIK, E., and SHEYERSON, S.: Nature (Lond.) 1950:166:526.
166. OLITZKI, L., STUCZYNSKI, L. A., HALEVI, C., and BERNKOPF, H.: J. infect. Dis. 1949:84:15.
167. OTTEN, E., HENZE, S., and GOETHE, H.: Z. Tropenmed. Parasit. 1954:5:187.
168. OTTOSEN, H. E.: Maanedsskr. Dyrlaeg. 1939—40:51:15, 46, 68.
169. OTTOSEN, H. E.: Maanedsskr. Dyrlaeg. 1941:53:173.
170. PAPAGEORGIU, S.: Z. Immunforsch. 1938:94:489.
171. PEDRO-PONS, A., and FARRERAS-VALENTI, P.: Schweiz. med. Wschr. 1952:82:947.
172. PICARD, J.: Bull. Acad. nat. Méd. (Paris) 1954:138:190.
173. PIKE, R. M., OWENS, H. B., and BURDETTE, R. I.: Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 1953:84:552.
174. PIKE, R. M., OWENS, H. B., and DALLAS, W. H.: J. Lab. clin. Med. 1954:44:609.
175. POPP, L.: Z. Hyg. InfektKr. 1950:131:575.
176. POT, A. W.: Lancet 1936:I:1290.
177. POT, A. W., and DORNICKX, CH. G. J.: Ned. T. Geneesk. 1935:79:5914.
178. RANDALL, R., and COOPER, H. K.: Science 1944:100:133.
179. RANDALL, R., WETMORE, P. W., and WARNER, A. R.: J. Lab. clin. Med. 1949:34:1411.
180. REINHARD, K. R.: Exp. Parasit. 1953:2:87.
181. RIEL, J. VAN: Ann. Soc. belge Méd. trop. 1946:26:197.
182. RIMPAU, W.: Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 1942:149:65.
183. RIMPAU, W.: Münch. med. Wschr. 1942:89:991 and 1943:90:48.
184. RIMPAU, W.: Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 1943:150:136.
185. RIMPAU, W.: Med. Mschr. 1948:2:475.
186. RISLAKKI, V., and SALMINEN, A.: Acta path. microbiol. scand. 1955: 37:121.
187. ROSENFELD, W. D., and GREENE, M. R.: J. Bact. 1941:42:165.
188. RUBARTH, S.: Scand. Vet. T. 1937:27:285.
189. RYNEBERG, J. W.: Finska LäkSällsk. Handl. 1890:32:746, 792.
190. RUY, A. CH., and SCHÜFFNER, W.: Ned. T. Geneesk. 1934:78:3110.
191. SALMINEN, A., and RUIKKA, I.: Duodecim (Helsinki) 1956:72: (in press).
192. SARDJITO, M., MOCHTAR, A., and WIRASMO, R.: Gen. T. Ned.-Ind. 1937:77:457.
193. SARDJITO, M., and POSTMUS, S.: Gen. T. Ned.-Ind. 1927:67:73.
194. SAVINO, E., and RENELLA, E.: Rev. Inst. bact. Malbrán 1944:12:215.
195. SAVINO, E., and RENELLA, E.: Dia méd. 1944:16:1349.

196. SAVINO, E., and RENELLA, E.: *Leptospirae y leptospirosis en la republica Argentina*, Al Atenas, Buenos Aires 1944.
197. SAVINO, E., and RENELLA, E.: *Rev. Soc. argent. Biol.* 1946:22:13.
198. SAVINO, E., and RENELLA, E.: *Rev. Inst. bact. Malbrán* 1949:14:26.
199. SAVINO, E., and RENELLA, E.: *Rev. Inst. bact. Malbrán* 1949:14:267.
200. SAVINO, E., and RENELLA, E.: *Rev. Inst. bact. Malbrán* 1949:14:270.
201. SCHMID, G., and GIOVANELLA, R.: *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 1947:89:1.
202. SCHNEIDERMAN, A., GREENE, M. R., SCHIELER, L., McCLURE, L. E., and DUNN, M. S.: *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 1951:78:777, and 1953:82:53.
203. SCHÜFFNER, W.: *Trans. roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1934:28:7.
204. SCHÜFFNER, W.: *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* 1940:145:341.
205. SCHÜFFNER, W., and BOHLANDER, H.: *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* 1939:144:434.
206. SCHÜFFNER, W., and BOHLANDER, H.: *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* 1942:148:264 and 1942:149:359.
207. SCHÜFFNER, W., and MOCHTAR, A.: *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* 1927:101:405.
208. SCHÜFFNER, W., SCHULTZ, TH. W., and POSTMUS, S.: *Ned. T. Hyg. Microbiol. Serol.* 1933:7:253.
209. SEMSKÓV, M. V.: *Z. VetKunde* 1941:53:7.
210. SIEVERS, R.: *Finska LäkSällsk. Handl.* 1891:33:1045 and 1896:38:127.
211. SIVONEN, L.: *Papers on Game-Research (Helsinki)* 1948:No. 1 and 2.
212. SIVONEN, L.: *Luonnon Tutkija (Helsinki)* 1951:55:72.
213. SIVONEN, L.: *Journal of Wildlife Management* 1954:18:41.
214. SIVONEN, L.: *Personal communication.*
215. SIPPEL, L. W., and ATWOOD, M. B.: *Symposium on the Leptospiroses, U.S. Government Printing Office, Washington* 1953: p. 143.
216. SMITH, J., and TULLOCH, W. S.: *Lancet* 1937:II:846.
217. STEIGNER, K. FR.: *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* 1950:156:216.
218. STENIUS, P. I.: 5. *Nordiske Veterinaermøde, København* 1939: Sektion 9.
219. STUART, R. D.: *Vet. Rec.* 1946:58:131.
220. STUHLFAUTH, K.: *Dtsch. med. Wschr.* 1943:69:439, 474.
221. SUTHERLAND, A. K., SIMMONDS, G. C., and KENNEY, G. C.: *Aust. vet. J.* 1949:25:197. Cited by WOLFF and BOHLANDER (254).
222. TAYLOR, J., and GOYLE, A.: *Indian med. Res. Mem.* 1931:20:1.
223. TARÁSOV, S. I.: *Ann. Inst. Pasteur* 1931:46:222.
224. TARÁSOV, S. I., and EPSHTEYN, H.: *Hyg. et Epidemiol. (Moskva)* 1928:No.9. Abstract in *Bull. Inst. Pasteur* 1928:27:928.
225. TERSKÍKH, V. I.: *Ž. Mikrobiol.* 1940:No.8:66. Abstract in *Bull. Hyg. (Lond.)* 1941:16:335.
226. TERSKÍKH, V. I.: *Veterinarija* 1940:No.6:21. Abstract in *Vet. Bull. (Weybridge)* 1942:12:207.
227. TERSKÍKH, V. I.: *Zbl. ges. Hyg.* 1942:49:107. Cited by GSELL (2) pp. 180—181.

228. TERZIN, A. L., BORDJOŠKI, M. N., MILAVANOVIC, M. V., STOJKOVIC, LJ. V., and DIMIC, M. M.: J. Hyg. 1954:52:129.
229. TIFFANY, E. J., and MARTORANA, N. F.: Amer. J. Hyg. 1942:36:195.
230. UHLENHUTH, P.: Z. ImmunForsch. 1943:104:338.
231. UHLENHUTH, P., and FROMME, W.: Med. Klin. 1915:11:1202, 1264, 1296, 1375.
232. UHLENHUTH, P., and FROMME, W.: Z. ImmunForsch. 1916:25:317.
233. UHLENHUTH, P., and FROMME, W.: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen (KOLLE, KRAUS, UHLENHUTH) 1930:VII:487.
234. VAGO, G.: Schweiz. med. Wschr. 1947:77:479.
235. VAGO, G.: Arch. Hyg. (Berl.) 1952:136:261.
236. VARVELLO, V.: Ann. Igiene 1940:163. Abstract in Zbl. Bakt., I. Abt. Ref. 1940:138:470.
237. VERVOORT, H.: Geneesk. T. Ned.-Ind. 1922:62:697.
238. VERVOORT, H.: Geneesk. T. Ned.-Ind. 1923:63:800.
239. VOIPIO, P.: Arch. Soc. »Vanamo» 1951:6:24 and 1952:7:78.
240. WALCH, E. W.: Geneesk. T. Ned.-Ind. 1926:66:115.
241. WALCH, E. W., and SOESILO, R.: Geneesk. T. Ned.-Ind. 1927:67:84.
242. WALCH-SORGDRAGER, B., SCHÜFFNER, W., and BOHLANDER, H.: Z. ImmunForsch. 1938:92:35.
243. WALLE, N., VAN DER: Ned. T. Geneesk. 1939:83:740.
244. WARD, T. G., and STARBUCK, E. B.: Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 1941:48:19.
245. WEIL, A.: Dtsch. Arch. klin. Med. 1886:39:209.
246. WEISS, M.: Wien. med. Wschr. 1890:40:425, 470, 516, 557.
247. WEISSFLOG, H.: Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 1952:65:124.
248. WIESMANN, E.: Ergebn. Hyg. Bakt. 1952:27:323.
249. WIKERHAUSER, T.: Schweiz. Z. allg. Path. Bakt. 1951:14:93.
250. WOLFF, J. W.: Arch. Schiffs- u. Tropenhyg. 1925:29:111.
251. WOLFF, J. W.: WHO/FAO Seminar on Zoonoses, Vienna 1952: p.151.
252. WOLFF, J. W.: Symposium on the Leptospiroses, U.S. Government Printing Office, Washington 1953: p.174.
253. WOLFF, J. W.: Cited by GSELL (85).
254. WOLFF, J. W., and BOHLANDER, H.: Documenta de Medicina Geographica et Tropica 1952:4:257.
255. WOLFF, J. W., BOHLANDER, H., and RUYS, A. C.: Antonie v. Leeuwenhoek 1949:15:1.
256. WOLFF, J. W., and BROOM, J. C.: Documenta de Medicina Geographica et Tropica 1954:6:78.
257. YAGER, R. H., GOUCHENOUR, W. S. Jr., ALEXANDER, A. D., and WETMORE, P. W.: Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 1953:84:589.
258. ZETTERHOLM, S. G.: Svenska LäkT. 1934:31:425.
259. ZUELZER, M.: Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 1936:136:194.
260. ZUELZER, M.: Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 1936:137:189.



AUS DEM WIIHURI-FORSCHUNGSINSTITUT

---

Über die Einwirkung  
von Karboxymethylzellulose (CMC) auf  
das Lungengewebe der Ratte

VON

T. KUMLIN

HELSINKI 1956

HELSINKI 1956  
HELSINGIN LIIKEKIRJAPAINO OY

## VORWORT

Dem Leiter des Wihuri-Forschungsinstitutes, Herrn Dr. med. Pentti Halonen, Professor der Inneren Medizin an der Universität zu Helsinki, möchte ich für das grosse Interesse, das er meiner Arbeit entgegengebracht hat, für seine freundliche und ermunternde Unterstützung sowie für die Möglichkeit, vorliegende Untersuchungen am Wihuri-Forschungsinstitut ausführen zu können, meinen hochachtungsvollen Dank aussprechen.

Auch Herrn Dozent Dr. med. E. K. Ahvenainen, dessen Erfahrung mir bei der Planung dieser Arbeit wertvolle Hilfe bedeutet hat, möchte ich herzlich danken.

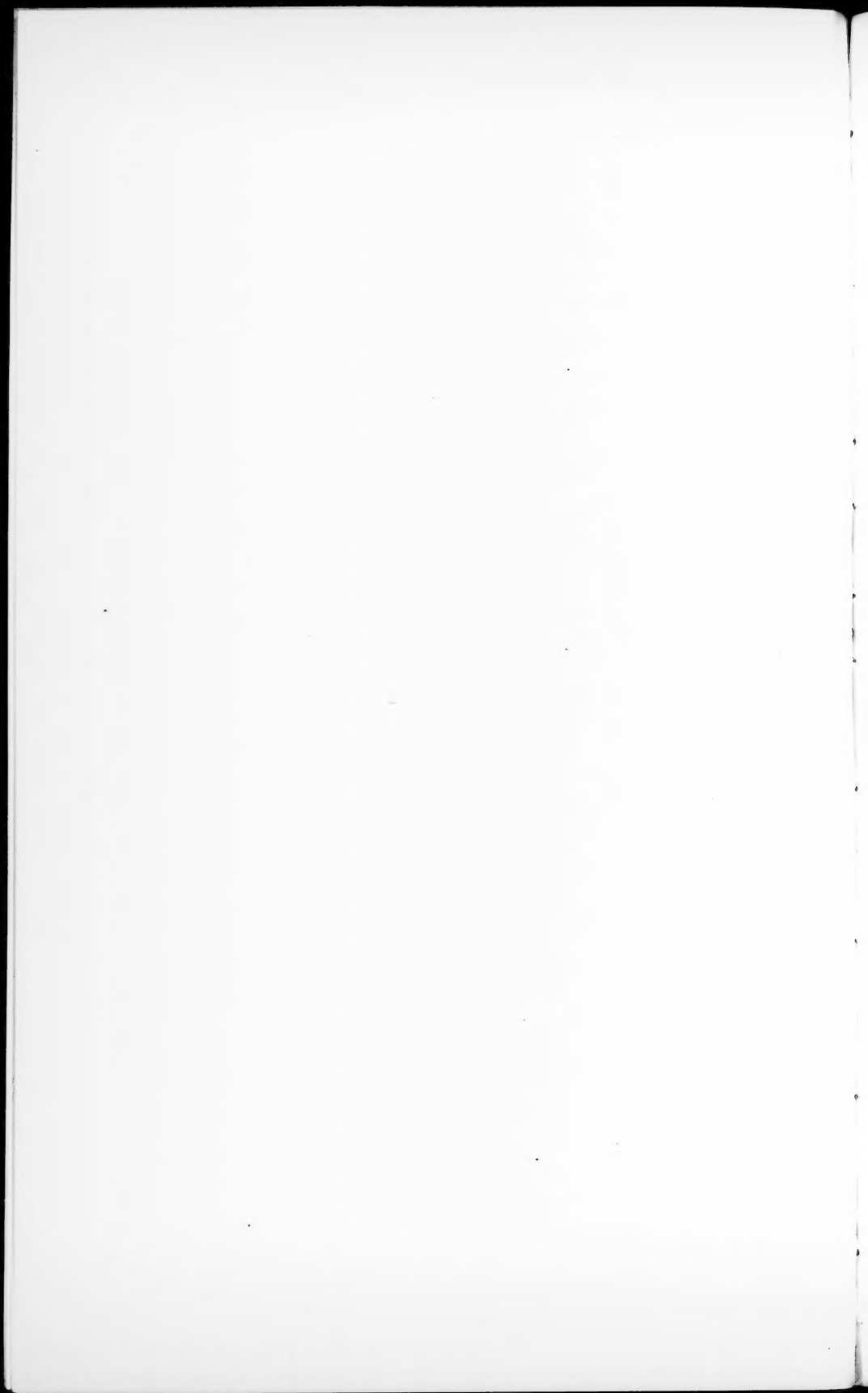
Herrn Dozent Dr. med. V. Ritama bin ich für sachverständige Anleitung in manchen Fragen der histologischen Untersuchung zu grossem Dank verpflichtet.

Ausserdem danke ich Herrn Dr. med. G. Härtel für die sachkundige Übertragung des Textes in die deutsche Sprache.

Fräulein L. Bismarck, Frau C. Hopea und Fräulein E. Kaprio haben mir bei der Herstellung der histologischen Präparate fleissig geholfen; die Mikroaufnahmen hat Herr Präparator T. Santamäki hergestellt. Ihnen allen sage ich Dank.

Helsinki, im Februar 1956

*T. Kumlin*





# INHALT

	Seite
<b>EINLEITUNG</b> .....	7
Älteste, sich auf therapeutische Anwendung gründende Kenntnisse über die Resorption intratracheal verabfolgter flüssiger Stoffe .....	7
Früher erfolgte Untersuchungen über die physiologie der Resorption und hierdurch bedingte pathologisch-anatomische Veränderungen ...	8
Über die Nachteile der zur Bronchographie benutzten Kontrastmittel, der sog. Jodöle .....	11
Untersuchungen über wasserlösliche Kontrastmittel zur Bronchographie	12
Über die physikalischen Eigenschaften der Karboxymethylzellulose ...	13
Bisherige Beobachtungen über die Wirkung von CMC auf den Organismus von Versuchstieren (mit Ausnahme der Lungen) .....	14
Beobachtungen über die Wirkung von CMC-Lösungen und CMC-haltigen Kontrastmitteln zur Bronchographie auf die Atmungsorgane von Versuchstieren .....	15
Klinische, Röntgenologische und Morphologische Erfahrungen über CMC-haltige, wasserlösliche Kontrastmittel zur Bronchographie .....	21
<b>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</b> .....	23
Intratracheal (-bronchial) injizierte Stoffe .....	24
Technik der intratrachealen (-bronchialen) Injektion .....	24
Über die Versuchstiere und deren Einteilung .....	27
Bakteriologische Untersuchung .....	28
Histologische Untersuchungstechnik .....	29
Allgemeines über die Anatomie der Atmungsorgane der Ratte .....	30
<b>ERGEBNISSE</b> .....	33
Sterblichkeit der Tiere .....	33
Bakteriologische Untersuchung .....	33
Makroskopische Betrachtung der Lungen und histologische Untersuchung .....	33
Kontrollserie I. ....	33
Kontrollserie II. (Ratten, die physiologische Kochsalzlösung erhalten hatten) .....	34
a) — Nebenserie, Injizierte Menge 0,1 ccm/100 g Körpergewicht	34
b) — Nebenserie, Injizierte Menge 0,2 ccm/100 g Körpergewicht	36

CMC-ratten .....	37
I. Hauptserie: Viskosität der CMC-Lösung 5 mal grösser als die von Wasser .....	37
a) — Nebenserie: Injizierte Menge 0.1 ccm/100 g Körpergewicht .....	37
b) — Nebenserie: Injizierte Menge 0.2 ccm/100 g Körpergewicht .....	42
II. Hauptserie: Viskosität der CMC-Lösung 10 mal grösser als die von Wasser .....	47
a) — Nebenserie: Injizierte Menge 0.1 ccm/100 g Körpergewicht .....	47
b) — Nebenserie: Injizierte Menge 0.2 ccm/100 g Körpergewicht .....	51
III. Hauptserie: Viskosität der CMC-Lösung 30 mal grösser als die von Wasser .....	58
a) — Nebenserie: Injizierte Menge 0.1 ccm/100 g Körpergewicht .....	58
b) — Nebenserie: Injizierte Menge 0.2 ccm/100 g Körpergewicht .....	63
 VERGLEICHENDE ZUSAMMENFASSUNG DER DURCH CMC IN DEN VERSCHIEDENEN SERIEN VERURSACHTEN LUNGEN-VERÄNDERUNGEN .....	70
Makroskopische Veränderungen .....	71
Mikroskopische Veränderungen .....	72
Verteilung der injizierten CMC auf die verschiedenen Teile der Lunge .....	72
Die Zellreaktion in den Atemgängen und Alveolen .....	73
Von den beschriebenen, als regelmässige Folge der Injektion anzusehenden Lungengewebsreaktionen abweichende Befunden .....	76
Wahrscheinlich durch mechanische Läsionbedingte Veränderungen .....	77
Bronchitische und peribronchitische Veränderungen .....	79
Reaktive Veränderungen des Bindegewebes .....	81
Reaktive Veränderungen der Pleura .....	84
 BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE .....	86
Schlussfolgerungen .....	92
 ZUSAMMENFASSUNG .....	94
 LITERATURVERZEICHNIS .....	98
 ABBILDUNGEN .....	103

## EINLEITUNG

ÄLTESTE, SICH AUF THERAPEUTISCHE ANWENDUNG GRÜNDENDE  
KENNTNISSE ÜBER DIE RESORPTION INTRATRACHEAL VERAB-  
FOLGTER FLÜSSIGER STOFFE

Schon vor über hundert Jahren wurden erstmalig zur Behandlung der Atmungsorgane Arzneimittel intratracheal verabfolgt. So behandelte Green (1841) im ganzen 106 Patienten mit Bronchitis, Asthma oder Tuberkulose, indem er bis zu zweimal wöchentlich  $\frac{1}{2}$ — $1\frac{1}{2}$  Drachmen verdünnte Silbernitratlösung in die Trachea spritzte. Das gleiche Verfahren wurde mit denselben Indikationen auch von Bennett (1857) angewandt. Beide Autoren heben die gute Verträglichkeit dieser Behandlung hervor. Alison (1853) injizierte Patienten, bei denen er Austrocknung der Trachea vermutete, Öl.

Es ist bekannt, dass Bergeron (1883) auf diese Weise ohne irgendwelchen Schaden verschiedene Arzneilösungen an Hunde, Kühe und Pferde verabfolgt hat; nähere Einzelheiten hierüber sind jedoch nicht zu erhalten. Penhale (1885) gab Kälbern, um deren Lungenparasiten zu vernichten, Terpentin, Karbolsäure sowie Chloroform und Schmaltz (1888) benutzte bei Pferden zur Behandlung des Morbus maculosus Lugolsche Lösung.

Nachdem Rosenberg (1886) angefangen hatte, zur Behandlung von Patienten mit Larynx tuberkulose Mentholöl anzuwenden, scheint hieraus mit kleinen Variationen eine Regelbehandlung entstanden zu sein, denn die Grundsubstanz der von den weiter unten aufgeführten Autoren benutzten Arzneistoffe war Olivenöl (70—90 %), dem gewöhnlich Menthol (5—20 %), Guajakol (2 %), Salol (20—30 %) sowie Jodoform oder Bromoform hinzugefügt waren. Die Hauptindikation für diese Art Behandlung war die Lungentuberkulose; chronische Bronchitis, Bronchiektasien sowie Bronchialasthma bildeten die

übrigen Indikationen. Von den Autoren, die diese Behandlung angewandt und deren Ergebnisse beschrieben haben, seien folgende erwähnt: Downie (1891), Stewart (1893), Campbell (1894), Bronner (1894), Thomas (1894), Mendel (1899), Thorpe (1896), Muir (1896), Murray (1900), Barton (1902), Andersson (1904), Hubbard (1904), de Souza (1905), Watson (1905), Foucher (1906), Decrequy (1907), Donellan (1908), Bécélère & Guisz (1910). Die Behandlung erfolgte mitunter sogar täglich. Die Dosis betrug ungefähr 9—12 ccm und die Behandlungsdauer variierte von 4 bis 480 Tagen, wobei im letzteren Fall im ganzen 1450 Spritzen verabfolgt wurden. Rosenberg begann 1904 bei der Behandlung der Lungentuberkulose Tuberkulininfusionen anzuwenden.

Obwohl die Ergebnisse für gut erachtet und keine Nebenerscheinungen beschrieben wurden, scheint, nach der Literatur zu urteilen, hiernach das Interesse für intratracheale Therapie erlahmt zu sein. Von den oben erwähnten Autoren hat keiner histologische Untersuchungen seines Materials angeführt.

#### FRÜHER ERFOLGTE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE PHYSIOLOGIE DER RESORPTION UND HIERDURCH BEDINGTE PATHOLOGISCH-ANATOMISCHE VERÄNDERUNGEN

Erst nachdem die intratracheale Therapie in Gang gekommen war, begann man, damit verbundene physiologische und pathologisch-anatomische Fragen zu untersuchen. Traube (1866) konnte als erster nachweisen, dass Fremdkörperteilchen in Form von Staub ins Lungenparenchym einzudringen vermögen. Slavjansky (1869) spritzte bei Kaninchen und Meerschweinchen nach Tracheotomie verschiedene Farblösungen u.a. Zinnober in die Trachea. Nach einer Woche fand sich bei der mikroskopischen Untersuchung freies Zinnober im Bronchialschleim, aber es fanden sich dort auch zinnoberhaltige Zellen, die an Leukozyten erinnerten. Diese waren auch in den Alveolen vorhanden. Nach 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub>—2 Monaten wurde kein freies Zinnober mehr gefunden, nur noch intrazelluläres im Alveolarepithel, im Lungenparenchym und in Lymphknoten. Ausserdem fanden sich während der ersten Woche deutliche Zinnoberteilchen in Leuko-

zyten, die der Bauchorta entnommen worden waren. Schottelius (1878) führte mit Holzkohlen- und Farbstoffstaub an Hunden und Kaninchen analoge Versuche durch und gelangte zu übereinstimmenden Ergebnissen. Ruppert (1878) liess Hunde und Kaninchen in einem geschlossenen Raum von Petroleumlampen gebildeten Russ einatmen. Nach ungefähr 2—3 Tagen waren in den Alveolen reichlich sog. Staubzellen vorhanden (v. Ins), dagegen wurden extrazellulär keine Russteilchen mehr angefundnen. Wasbutzky (1879) untersuchte die Resorptionsgeschwindigkeit verschiedener Flüssigkeiten. Er injizierte Kaninchen intratracheal Kaliumferrozyanidlösung, und schon nach 7 Min. liess sich dieser Stoff im Harn mit Hilfe einer Farbreaktion (Eisenchlorid) nachweisen. Stellte man die gleiche Farbreaktion mit Serum aus der A. carotis externa an, so wurden die Ergebnisse bereits nach 10 Min. negativ, nachdem sie vorher die ganze Zeit positiv ausgefallen waren. Die intratracheale Letaldosis für KJ-Lösung stimmte mit der intravenösen Letaldosis überein und betrug  $\frac{1}{8}$  der subkutanen Dosis. Auf intratracheale Applikation von Atropinlösung trat Mydriasis 2,5 mal schneller ein als nach subkutaner Gabe, und die Narkosewirkung von Chloralhydrat setzte 7 mal schneller ein. Die tödliche Strychnindosis war intratracheal die gleiche wie intravenös, und die Wirkung erfolgte 3 mal schneller als nach subkutaner Gabe. Peiper (1884) zeigte, dass Kaninchen gut 70 ccm destilliertes, körperwarmes Wasser als intratracheale Infusion vertragen und dass ein mittelgrosser Hund entsprechend in einer Stunde 250 ccm verträgt. Er untersuchte ferner die Resorptionsgeschwindigkeit mit gleichen Verfahren wie Wasbutzky und gelangte auch zu gleichen Ergebnissen. Er beobachtete jedoch eine Beschleunigung der Resorption, wenn das Tier während des Experiments senkrecht hängend gehalten wurde. Mit Rindergalle, Hühnereiklarlösungen und Milch wies Peiper die langsame Resorption zähflüssiger Stoffe nach. Ausserdem zeigte er, dass eine beiderseitige Durchtrennung des N. vagus oder phrenicus in keiner Weise auf die Resorptionsgeschwindigkeit wirkte.

Auf Grund seiner Versuche gab Sehrwald (1886) an, dass ein Hund als Einzeldosis ausgezeichnet 10—25 g indifferente Flüssigkeit zu resorbieren vermag, was ungefähr  $\frac{1}{25}$ — $\frac{1}{10}$  dessen mittleren Lungenvolumens ausmacht. Durch Gewöhnung,

indem täglich injiziert und die Einzeldosis gleichzeitig vergrößert wurde, sowie durch Anwendung von Narkose konnte diese Flüssigkeitsmenge bis zu 775 g gesteigert werden, welche innerhalb von zwei Stunden in die Trachea gespritzt wurde. In knapp fünf Tagen konnte ein Hund somit auf intratrachealem Wege eine Flüssigkeitsmenge resorbieren, deren Gewicht das Vierfache seines Körpergewichtes betrug. Sehrwald hebt auch die Bedeutung der physikalischen Eigenschaften der Stoffe für deren Resorption hervor und erwähnt, dass dickere Flüssigkeiten, z.B. Gummi arabicum, weniger reizen, da sie langsamer herabfließen und eine grössere Adhäsion besitzen. Nach Ansicht von S. lässt sich hiermit die Tatsache erklären, dass bei den vorzeitigen Atembewegungen des Foeten mit dem Liquor amnii Vernix und Lanugo in die Bronchiolen und Alveolen gelangt, wohingegen die zähen Schleimmassen in den grösseren Bronchien verbleiben. Ferner stellte S. fest, dass mit entsprechender Lagerung und genügender Flüssigkeitsmenge der eingespritzte Stoff in jeden beliebigen Teil der Lunge gelenkt werden kann. Nachdem Botey (1890) festgestellt hatte, dass ein Pferd erst nach einer Wasserinfusion von 32 Litern starb, liess er sich 50 ccm Aq.dest. intratracheal spritzen, ohne irgendwelche nachteilige Wirkung zu verspüren.

Eine von diesen experimentellen Untersuchungen etwas abweichende Gruppe bilden jene Untersuchungen, mit deren Hilfe man die Bedeutung von aspiriertem Blut zu klären versucht, sowie Antwort auf die Frage, ob es eine »Phthisis ex haemoptoe« gibt, gesucht hat. Perl und Lipman (1870), Sommerbrodt (1872) Nothnagel (1877), sowie Fleiner (1888) liessen Versuchstiere deren eigenes Blut aspirieren. Die Ergebnisse aller zeigten übereinstimmend, dass auch ein korpuskulärer Stoff dieser Art resorbiert wurde, indem das aspirierte Blut (Erythrozyten) bis in die Alveolen drang und die grossen Bronchien schon nach 12 Stunden frei waren. Einen Tag später erschienen grosse, an Leukozyten erinnernde Zellen in den Alveolen. Entzündliche Veränderungen wurden nicht festgestellt.

Als eine eigene Gruppe seien jene Untersuchungen erwähnt, durch die man den Entstehungsmechanismus der Pneumokoniosen, d.h. die Einwanderung von Staubteilchen zu erklären versucht hat. Von den bereits erwähnten Autoren kamen Traube

(1866), Slavjansky (1869) und Ruppert (1878) zu dem Ergebnis, dass die Staubteilchen als solche in das Lungengewebe eindringen können. Später haben ebenfalls im Tierversuch Drinker (1922), Robson, Irwin und King (1934) gezeigt, dass gewisse Silikatteilchen und Gross und Westrick (1954), dass Kohle- teilchen in das Lungenparenchym eindringen können. Cameron und Lang (1933) dagegen behaupten, dass Makrophagen nach der Phagozytose von Staubteilchen nicht ins Lungenparenchym eindringen.

Dagegen sind die schon erwähnten Forscher v. Ins (1878) und Schottelius (1878) sowie später Klotz (1914), Permar (1920), Haynes (1931) und Gardner (1932) auf Grund ihrer Versuche zu dem Ergebnis gelangt, dass die Teilchen aus den Alveolen nur mit Hilfe von bestimmten phagozytierenden Zellen ins Parenchym gelangen können. Noch eine dritte Möglichkeit ist vorgebracht worden. Demzufolge können die Teilchen sowohl als solche die respiratorische Membran durchdringen als auch, nachdem sie von Makrophagen phagozytiert, ins Lungenparenchym gelangen. Diese Ansicht haben vertreten Slavjansky (1869), Ruppert (1878), Lemon und Higgins (1932), Robertson (1941) und Drinker (1952).

#### ÜBER DIE NACHTEILE DER ZUR BRONCHOGRAPHIE BENUTZTEN KONTRASTMITTEL, DER SOG. JODÖLE

Nachdem die Röntgenuntersuchung eine immer grössere klinische Verwendung gefunden hatte, begann man schon früh nach Hilfsmitteln zur Vervollständigung der Röntgendiagnostik der Atmungsorgane, d. h. zur Erschaffung einer Bronchographie, zu suchen. Als erster hat sie wohl Springer (1906) versucht, aber erst Jackson (1918) gelang sie, indem er Wismutpulver verwandte. Lynah und Stewart (1921) begannen in Öl suspendiertes Wismutpulver und Sicard und Forrestier (1923) die heutzutage als Routineverfahren gebrauchte Lipiodolbronchographie anzuwenden. Als Grundsubstanz der betreffenden Kontrastmittel, der sog. Jodöle (z.B. Lipiodol, Jodipin) wird irgendein Öl wie z.B. *Oleum rapae* verwendet, um die nötige Viskosität zu erhalten.



Trotz ihrer Vorzüge besitzen die Jodöle auch viele Nachteile. Erstens können nach der Anwendung Zeichen einer akuten Jodvergiftung, von Jodüberempfindlichkeit sowie von Hyperthyreose auftreten. Zweitens, und dies ist wohl der schwerwiegendste Nachteil, verhält sich das Lungengewebe den Jodölen gegenüber nicht immer so, als handele es sich um einen indifferenten Stoff, sondern es können verschiedenartige akute und chronische Lungenläsionen auftreten. Man hat Fälle beschrieben, in denen eine plötzliche, zum Teil nekrotisierende Pneumonie aufgetreten ist, sowie Fälle, in denen eine schwere Lungenfibrose und Schrumpfung als Folge einer chronischen Pneumonie entstanden ist. Ausserdem kann nach einer Bronchographie mit Jodöl noch nach Monaten ja sogar nach Jahren röntgenologisch feststellbares Kontrastmittel in den Lungen vorhanden sein. Teils auf Grund klinischer Beobachtungen, teils auf Grund von Tierexperimenten haben unter anderen folgende Autoren die Nachteile der Jodöle hervorgehoben: Weinberg (1933), Douglas (1935), Bezancon, Delarue und Valet-Bellot (1935), Braibanti (1937), Storrs, McDonald und Good (1949) sowie Fischer (1950), welcher betont, dass die beobachteten Veränderungen mit den nach Verwendung ölhaltiger Nasentropfen sowie nach Aspiration anderer ölhaltiger Arzneimittel entstandenen Lipoid- und Ölpneumonieveränderungen identisch sind.

#### UNTERSUCHUNGEN ÜBER WASSERLÖSLICHE KONTRASTMITTEL ZUR BRONCHOGRAPHIE

Die Nachteile der Jodöle bildeten den Grund, dass man intensiv geeignete wasserlösliche Kontrastmittel zu finden versuchte. Gleichzeitig suchte man nach Mitteln, um die Viskosität der Wasserlösung des Kontrastmittels derart zu erhöhen, dass eine ausreichende Adhäsion an die Wandungen der Atemwege und eine Verlangsamung des Abfliessens in die Peripherie erreicht wurde. Bis jetzt hat man als Viskosität steigernde Stoffe u.a. Gummi arabicum, Tragacanthia, Pektin, Akazia, Dextrin, polymerisierten Polyvinylalkohol sowie Äther bestimmter Zellulose-derivate ausprobiert. Hiervon schieden die beiden ersten schon während der Erprobung aus, da sie subkutan oder intravenös



injiziert Veränderungen im Blutbild hervorriefen. Morales und Heiwinkel (1948) veröffentlichten als Ergebnis ihrer Untersuchungen über Pektin, Akazia und Dextrin, dass hiervon eine zu grosse Konzentration erforderlich sei, um eine ausreichende Viskosität zu erhalten, und dass sich diese Stoffe nicht für eine Benutzung mit dem von ihnen angewandten Kontrastmittel Umbradil eigneten. Polyvinylalkohol wiederum, z.B. beim Kalb intraartikulär verabfolgt, erwies sich als zu stark reizend. Schliesslich kamen sie zu dem Ergebnis, dass karboxylierte Zellulose für diesen Zweck am geeignetesten sei.

#### ÜBER DIE PHYSIKALISCHEN EIGENSCHAFTEN DER KARBOXYMETHYLZELLULOSE

Im Schrifttum wird von diesem Stoff die Abkürzung CMC gebraucht, und im Englischen ist er auch unter den Namen cellulose gum oder sodium cellulose glycolate bekannt. In der deutschsprachigen Literatur wird der Name Natrium carboxymethylcellulose oder Natriumsalz von Celluloseglykolsäureäther verwandt.

CMC ist ein Zellulose-ester, welcher durch Behandlung alkalischer Zellulose mit Monochloressigsäure hergestellt wird. Die Herstellung kann durch die Formel  $\text{RONa} + \text{ClCH}_2\text{COONa} \rightarrow \text{ROCH}_2 + \text{NaCl}$  dargestellt werden, wobei R die Zellulosegruppe bedeutet. Das Natriumsalz dieser Verbindung löst sich leicht in Wasser und bildet sogar in so schwachen Konzentrationen wie 1 bis 3 ‰ haltbare, hochvisköse, klare Lösungen, welche auch bei höheren Temperaturen nicht gerinnen. Erst wenn die Lösung längere Zeit über 70° C erwärmt wird, treten Veränderungen in der Viskosität auf. Nach Fischer (1948) besitzen CMC-Produkte verschiedener Fabriken geringgradig von einander abweichende Eigenschaften.

BISHERIGE BEOBACHTUNGEN ÜBER DIE WIRKUNG VON CMC AUF  
DEN ORGANISMUS VON VERSUCHSTIEREN  
(MIT AUSNAHME DER LUNGEN)

Da viele später zu erwähnende Forscher bei ihren experimentellen Untersuchungen neben CMC-Lösungen auch verschiedene im Handel befindliche CMC-haltige, für die Bronchographie vorgesehene Kontrastmittel verwandt haben, und da auf die hiermit gewonnen klinischen Erfahrungen später hingewiesen wird, sind in der folgenden Tabelle die wichtigste Eigenschaften dieser Mittel auf Grund zur Verfügung stehender Angaben dargestellt.

Name des Fabrikats	Fabrik	Kontrastmittelgehalt	CMC-Gehalt	Angaben über die Viskosität
Umbradil-Viskös B	Astra	35 ‰	2,5 ‰	500 centipoises bei 25 °C
Joduron B	Cilag	50 ‰	2,5 ‰	4,100 centipoises bei 36 °C
Propyliodon-Cilag	»	Nicht angegeben	Nicht angegeben	Ungefähr dieselbe wie von Joduron B
Dionisil Aqueous	Glaxo	50 ‰	0,75 ‰	Keine näheren Angaben
Per-Abrodil »BR« 60 ‰ viskös	Bayer	60 ‰	Nicht angegeben	Keine näheren Angaben

*Anmerkung:* Alle oben erwähnten Fabrikate enthalten das gleiche jodhaltige Kontrastmittel: Diäthanolaminsalz der Dijodopyridonessigsäure. Sie enthalten ferner entweder ein Lokalanästhetikum, einen die Oberflächenspannung herabsetzenden Stoff oder ein Konservierungsmittel. Alle durchgeführten Untersuchungen ergeben übereinstimmend, dass das eigentliche jodhaltige Kontrastmittel im Verlauf einiger Stunden aus der Lunge resorbiert wird.

Nach Fischer (1948) ist die Dosis tolerata von CMC 0,5 g/Kg Körpergewicht. Brown und Houghton (1941) sowie Werle (1941) verfütterten diesen Stoff an Hunde und Ratten. Sie konnten an den inneren Organen dieser Tiere keine hierdurch bedingten Veränderungen feststellen. Hueper (1945) spritzte

Hunden auf der Suche nach einem Plasmaersatz 3 Monate lang täglich CMC-Lösung intravenös, jedem Tier im ganzen etwa 20 g CMC. Während des Versuches trat vorübergehend Leukopenie, Absinken des Hämoglobins und Ansteigen der BKS auf. In der untersuchten Organen fand er Ablagerung des injizierten Stoffes in retikuloendothelialen Zellen der Leber und der Milz sowie in der Niere in den Endothelzellen der Glomeruli und in den interstitiellen Zellen. Ausserdem fand er atheromatöse Ablagerungen in der Aorta und deren Abzweigungen. In den Lumina der Nierentubuli beobachtete er mit Hämatoxylin-Eosin sich bläulich anfärbende Zylinder als Zeichen dafür, dass das injizierte Material durch die Nieren ausgeschieden worden war. Morales und Heiwinkel (1948) spritzten 2,5 %ige CMC-Lösung intraartikulär beim Kalb, ohne Zeichen einer Reizung festzustellen.

#### BEOBSACHTUNGEN ÜBER DIE WIRKUNG VON CMC-LÖSUNGEN UND CMC-HALTIGEN KONTRASTMITTELN ZUR BRONCHOGRAPHIE AUF DIE ATMUNGSORGANE VON VERSUCHSTIEREN

Hellström und Holmgren (1949) suchten im Tierversuch die Resorption von CMC sowie durch CMC im Lungengewebe verursachte Reaktionen zu klären. Sie benutzten hierfür 17 Kaninchen und 130 weisse Ratten. Nach Tracheotomie erhielt der grösste Teil der Tiere entweder CMC-Lösung (deren Konzentration nicht angegeben wird), physiologische Kochsalzlösung oder Umbradil-Viskös B jeweils 0,1 ml/ 100 g Körpergewicht durch einen Katheter in die Trachea. Die längste Beobachtungszeit betrug 3 Wochen. Wegen einer offenbaren Erstickungsgefahr wurden die Tiere nach der Massnahme ungefähr eine Stunde lang in der Senkrechten gehalten. Physiologische Kochsalzlösung wurde angewandt, um zu klären, wie weit ein fremder Inhalt in den Atemgängen schon an sich Reaktionen zur Folge hat.

Hellström und Holmgren halten verdickte Septen, vermehrten Blutgehalt und das Erscheinen von vergrösserten Phagozyten in den Alveolen als einen vom Normalen abweichenden Befund, betonen jedoch, dass besonders verdickte Septen auch bei intakten Ratten festzustellen sind. Als spezifische Färbung

zum Nachweis der CMC in histologischen Präparaten sahen sie die Toluidinblaufärbung an. In den Lungenalveolen der Tiere, die CMC-Lösung erhalten hatten, war bereits nach einer halben Stunde reichlich Inhalt zu finden. Verdickung der Septen sowie vermehrter Blutgehalt war ebenfalls festzustellen. Ausserdem war in vielen Fällen nach 6 bis 12 Stunden die alveoläre Struktur in den CMC-haltigen Gebieten fast völlig verschwunden. Die Alveolärphagozyten waren hypertrophisch und deutliche Zeichen der Phagozytose waren sichtbar. Nach einer Woche war das histologische Bild schon fast normal, nur in einigen Fällen wurden wechselnde Körnermengen enthaltende Phagozyten angetroffen.

Die Autoren sind der Ansicht, dass Umbradil-Viskös B grundsätzlich gleiche Veränderungen verursacht. So wirkte das mikroskopische Bild bereits nach drei Wochen in jeder Beziehung normal, nur die Alveolarsepten waren leicht verdickt und in den Phagozyten fand sich spärlich einverleibter Stoff.

Physiologische Kochsalzlösung rief ähnliche Veränderungen hervor wie sowohl die CMC-Lösung als auch das gerade erwähnte Kontrastmittel. So waren die Septen verdickt, der Blutgehalt des Lungengewebes war erhöht und die Phagozyten in den Alveolen waren hypertrophisch. Die Verfasser geben bei dieser Gruppe keine Beobachtungszeiten an.

Hellström und Holmgren sind der Ansicht, dass CMC wegen ihrer hohen Viskosität an den Wänden der Bronchien und Alveolen haftet und dass sie wegen ihres verhältnismässig grossen Molekylgewichtes nicht direkt resorbiert, sondern von Phagozyten aufgenommen wird, wonach sie entweder in ihnen zerfällt oder aus ihnen ins Blut gelangt. Die Verfasser halten die beschriebenen Veränderungen für vorübergehend.

Vischer (1951) spritzte nach Tracheotomie 6 Meerschweinchen und 20 Ratten jeweils 0,1 ml/100 g Körpergewicht physiologische Kochsalzlösung, CMC-Lösung (deren Konzentration nicht angegeben) oder Joduron B-Kontrastmittel. Die längste Beobachtungszeit betrug 4 Monate. Zum Nachweis von CMC im histologischen Präparat benutzte Vischer Weinstensäure-Thioninfärbung (Feyrter), welche zwar zum Nachweis von CMC geeignet ist, in gleicher Weise aber auch den Bronchialschleim färbt. Bei der mikroskopischen Untersuchung waren

nach Verlauf eines Tages die Septen verdickt, und die Zahl der Leukozyten und Fibrozyten war vermehrt. Ausserdem traten grosse, einkernige, losgelöste Alveolarepithelzellen auf, welche phagozytierte CMC in Form von kleinen, mit der Thioninfärbung sich rot anfärbenden Teilchen enthielten. Nach elf Tagen waren die Septen noch immer verdickt, aber die lymphozytäre und leukozytäre Reaktion war geringer. Nach vier Monaten war der injizierte Stoff noch deutlich nachweisbar. Bei makroskopischer Betrachtung fand sich in der Lunge einer Ratte ein glasgrauer, ungefähr erbsengrosser Herd. Bei der mikroskopischen Untersuchung enthielten die Alveolen in diesem Herd besonders reichlich CMC sowie auch CMC-Teilchen enthaltende Phagozyten, und die Bronchien waren fast völlig mit Phagozyten verstopft. An einigen Stellen fand man mehrkernige Riesenzellen. Die Septen waren verdickt, und mancherorts lagen reichlich Ansammlungen eosinophiler Leukozyten vor.

Vischer erwähnt nichts über eine möglicherweise durch physiologische Kochsalzlösung verursachte Reaktion. In den Lungen der Tiere, die Joduron B erhalten hatten, fanden sich die gleichen Veränderungen wie nach CMC. Aus dem Ergebnis seiner Untersuchungen schliesst Vischer, dass das eigentliche Kontrastmittel schnell resorbiert wird, dass aber dessen Vehikel CMC in den Lungen verbleibt.

Zollinger (1951) injizierte 9 Meerschweinchen durch die Haut 2 ccm Joduron B-Kontrastmittellösung in die Lunge. Nach fünf Tagen enthielten die Alveolarphagozyten keine metachromatisch sich anfärbende Teilchen mehr. Auch entzündliche Veränderungen wurden nicht festgestellt. Die längste Beobachtungszeit betrug 14 Tage. Um den Bronchialschleim im histologischen Präparat von CMC zu unterscheiden, benutzte Zollinger die Perjodatfärbung (Hotchkiss), da CMC hierdurch überhaupt nicht angefärbt wird.

Werthemann und Vischer (1951) injizierten im ganzen 12 Ratten 0,15 ccm CMC-Lösung (deren Konzentration nicht angegeben wird) oder Joduron B-Lösung, wobei die Beobachtungszeit eine Woche bis 18 Monate betrug. In den Lungen sämtlicher Tiere stellten sie auf Grund der Thionin- und Perjodatfärbung CMC sowie als reaktive Veränderungen Verdickung der Septen und geringgradige Desquamation des Alveolarepithels fest.

Hentel, Cohen und Brandenstein (1952) sind über Joduron B der Ansicht, nachdem sie es an 30 Meerschweinchen intratracheal erprobt, dass es nur vorübergehende Veränderungen in deren Lungen hervorruft. So verschwanden die während des ersten Tages aufgetretenen peribronchialen und perivaskulären Rundzellinfiltrate im Verlauf von zwei Wochen. Nach 12 Wochen war kein injizierter Stoff mehr feststellbar.

Zollinger und Fischer (1953) wollten besonders die Bedeutung peripher und forciert erfolgender Injektion von Joduron B auf die Entstehung möglicherweise durch diesen Stoff verursachter Lungenveränderungen untersuchen. Zu diesem Zweck führten sie bei 21 Kaninchen eine Bronchographie mit 2 bis 4 ccm Joduron B durch, und 4 Wochen später wurden die Tiere getötet. Hierbei ergab sich, dass in Zusammenhang mit starker peripherer Füllung, d.h. mit Füllung der Bronchiolen und Alveolen, regelmässig wochenlang anhaltende CMC-Retention in Form kleiner CMC-Knötchen auftrat, denen sich Proliferation phagozytierender Zellen anschloss. Unter diesen Fällen waren zwei solche, in denen kleine CMC-Granulome vorhanden waren mit dazugehöriger Fibrozyten- und Kapillar-proliferation, mit Lymphozyten, Plasmazellen und einigen Fremdkörperriesenzellen. Dagegen trat überhaupt keine CMC-Retention auf, wenn sich die Bronchographie auf die grossen Bronchien beschränkte. Zollinger und Fischer äusserten deshalb die Ansicht, dass ein Grund für die CMC-Retention eine »übermässige« Füllung des Lungenparenchyms, der Bronchiolen und der Alveolen sein könnte, bedingt durch einen zu grossen Injektionsdruck, eine zu grosse Menge des benutzten Kontrastmittels, mangelnde Viskosität des Kontrastmittels oder durch Ventilwirkung als Folge von Tumoren und entzündlichen Prozessen oder durch irrtümliche Injektion direkt ins Parenchym.

Weber und Löhr (1953) spritzten 21 Ratten nach Tracheotomie 0,2 ccm Per-Abrodil »BR« 60 % viskös und 6 Ratten 0,3 ccm physiologische Kochsalzlösung in den linken unteren Bronchus. Ausserdem führten sie bei 14 Kontrolltieren auch eine Tracheotomie und Einführung des Katheters in den erwähnten Bronchus durch, ohne jedoch Kontrastmittel einzuspritzen. An Stelle der Perjodatfärbung (Hotchkiss) der histologischen Präparate verwandten sie die damit fast identische Perjodat-



Leukofuchsinfärbung (McManus). Nach zwei Stunden liess sich der injizierte Stoff auch in den Alveolärgängen und Alveolen nachweisen, und man konnte ihn auch in der rechten, der nicht injizierten Lunge feststellen. Das Lungenparenchym war hyperämisch, und die Alveolarsepten enthielten Granulozyten. Nach sechs Stunden fanden sich in den Alveolen reichlich makrophagenartige Zellen. Zehn Tage später war die Hyperämie verschwunden, aber die Zahl der Phagozyten war ungefähr die gleiche. Noch nach 2 bis 8 Tagen liess sich injizierter Stoff nachweisen, und ausserdem wurden reichlich Makrophagen, jedoch keine Riesenzellen gefunden. Die Autoren halten diese Befunde nicht für spezifisch durch das injizierte Kontrastmittel verursacht, denn in den Lungen der Kontrolltiere fanden sie ebenfalls häufig makrophagenartige Zellen, verdickte Septen und sogar ausgedehnte Pneumonien.

Hellström (1953) führte mit 80 weissen Ratten eine erneute Untersuchung durch, deren Zweck es war die durch Umbradil-Viskös B und Joduron B verursachten Lungenveränderungen miteinander zu vergleichen. Von beiden Stoffen wurden jeweils 0,1 ccm/100 g Körpergewicht intratracheal gespritzt, und die Beobachtungszeit betrug bis zu 6 Monate. Ausser der Toluidinfärbung wurde zum Nachweis von CMC auch die Perjodatfärbung ausgeführt. Übereinstimmend mit den früheren Ergebnissen von Hellström und Holmgren zeigte sich auch jetzt, dass Umbradil-Viskös B innerhalb von zwei Tagen zum grössten Teil aus den Bronchiolen und Alveolen verschwunden war, dass aber nach 2 und 3 sowie 6 Monaten noch in einigen Alveolen sowie in einigen Phagozyten minimale Spuren verdünnten Kontrastmittels vorhanden waren. Dagegen schien Joduron B schwere Veränderungen zu verursachen. Nach zwei Tagen fand sich reichlich CMC in erweiterten Bronchiolen und Alveolärgängen, und das periphere Lungengewebe war teilweise oder völlig kollabiert. Dieser Zustand wie auch reichlich CMC waren ein bis 6 Monate feststellbar. Zwei bis drei Monate nach der Injektion trat Vermehrung des Bindegewebes auf, und der Zellenbefund wurde für eine chronische Entzündung charakteristisch. Hellström hält die grössere Viskosität des Joduron B und die dadurch bedingte längerdauernde Retention in den Bronchien und deren Obliteration für den Grund dieses deutlichen Unter-

schiedes zwischen Umbradil-Viskös B und Joduron B. Die hierdurch verursachte Atelektase erschwert nach Hellström noch ausserdem die CMC-Resorption. Einen weiteren Grund kann nach seiner Ansicht die grössere Molekylgrösse der im Joduron B enthaltenen CMC darstellen, welche die Phagozytose erschwert.

Schmidtman und Anger (1954) führten ebenfalls eine vergleichende Untersuchung über durch Joduron B und CMC-Lösung (deren Kontzentration nicht angegeben) möglicherweise verursachte Lungenveränderungen durch. Im ganzen 18 Meerschweinchen erhielten nach Trachotomie 0,15 ccm Lösung in Höhe des rechten oder linken Hilus injiziert. Man hatte versucht, die Reaktionsbereitschaft bei zwei Tieren dadurch zu erhöhen, dass man sie vorher mit Kaninchenserum sensibilisiert hatte. Bei der histologischen Untersuchung konnte injizierter Stoff schon am folgenden Tage in beiden Lungen festgestellt werden und zwar allgemein reichlicher in den Bronchien als in den Alveolen. Nach 6 Tagen trat vorübergehend katarrhalische Entzündung der Bronchialschleimhaut mit starker Phagozytenreaktion. Nach 12 Tagen wurden spärlich Fremdkörperriesenzellen sowie reichlich eosinophile Leukozyten beobachtet. Die zelluläre Proliferation war zwischen 12. und 24. Tag am stärksten. In den Lungen derjenigen Tiere, die Joduron B erhalten hatten, fand sich eine stärkere Zellreaktion als bei den anderen Tieren nach CMC-Lösung. Der Lungenbefund der oben erwähnten sensibilisierten Tiere wich in keiner Weise von dem der übrigen Tiere ab. In den Bronchien und Alveolen der nach der längsten Beobachtungszeit von 96 Tagen getöteten Tiere fanden sich nur CMC-Reste. In den Alveolen waren spärlich Phagozyten; ein grosser Teil der Alveolarsepten war verdickt. Die Autoren sind der Ansicht, dass eine bei Meerschweinchen mit CMC-haltigen Stoffen durchgeführte Bronchographie keine bleibende Veränderungen in deren Lungen verursacht.



KLINISCHE, RÖNTGENOLOGISCHE UND MORPHOLOGISCHE ERFAHRUNGEN ÜBER CMC-HALTIGE, WASSERLÖSLICHE KONTRASTMITTEL ZUR BRONCHOGRAPHIE

Morales und Heiwinkel (1948) führten bei einigen Patienten mit Umbradil-Viskös B eine Bronchographie durch, ohne Nebenerscheinungen zu beobachten. Auf Grund der Röntgenuntersuchung war das Kontrastmittel nach 3 Stunden völlig resorbiert. Im Jahre 1949 hatte Morales mit dem gleichen Kontrastmittel bereits über 1000 Bronchographien ohne Nebenwirkungen ausgeführt.

Fischer (1950) benutzte bei 500 Personen zur Bronchographie Joduron B. Die mittlere Kontrastmittelmenge betrug 20—30 ccm, und Fischer berechnete, dass der Organismus jedes Patienten ungefähr 0,3 bis 0,4 g CMC zu eliminieren hatte. Der Autor liess sowohl vor als auch in 3 stündigen Abständen nach der Bronchographie die Sauerstoffsättigung, den Kohlen säuregehalt und das pH des arteriellen Blutes der Patienten bestimmen. Die Ergebnisse wiesen in Richtung einer vorübergehenden relativen Insuffizienz der Atmungsfunktion, deren Ausmass einer akuten oder chronischen Bronchitis entsprach. Nach 24 bis 36 Stunden waren die obigen Werte normal.

Vischer (1951) untersuchte histologisch die Lungen von sechs gestorbenen oder operierten Patienten 6 bis 90 Tage nach einer mit Joduron B durchgeführten Bronchographie. Er stellte in sämtlichen Fällen noch vorhandenen injizierten Stoff fest sowie zum Teil sogar schwere Veränderungen, von denen eine reichliche Entstehung von Fremdkörperriesenzellen am auffälligsten war.

Zollinger (1951) untersuchte durch Lobektomie oder Pulmektomie erhaltenes Lungengewebe von 25 Patienten bei denen 6 bis 67 Tage zuvor mit Joduron B eine Bronchographie durchgeführt worden war, aber er konnte keine bleibende Veränderungen feststellen, deren Entstehung auf das Kontrastmittel hätte zurückgeführt werden können.

Das Untersuchungsmaterial von Schmidtman und Dick (1952) umfasste 72 Fälle mit Lungenoperation. Bei 47 hiervon hatte man 3 bis 240 Tage vorher eine Bronchographie mit Joduron B durchgeführt. In 15 Fällen liess sich noch nach 24

Tagen CMC nachweisen. In zwei Fällen konnten sie feststellen, dass ein Granulom mit Riesenzellen um die CMC-Reste herum entstanden war. Die Autoren kommen jedoch zu dem Ergebnis, dass 50 Tage nach der Bronchographie keine durch das Kontrastmittel verursachte Veränderungen mehr feststellbar sind.

Zollinger und Fischer (1953) hatten bei über 2000 Personen eine Bronchographie mit Joduron B vorgenommen, von denen 100 Fälle postoperativ histologisch untersucht werden konnten. Die Zeit zwischen Bronchographie und Operation betrug 29 Stunden bis 9 Monate. In drei Fällen fanden sie Granulome mit Fremdkörperriesenzellen und Bindegewebsveränderungen.

Weber und Löhr (1953) haben ein Material veröffentlicht, welches die Befunde von 15 Lungen umfasst, welche 18 Tage bis 7 Wochen nach Bronchographie mit Per-Abrodil »BR« 60 % viskös operiert wurden. In vier Fällen liessen sich CMC-Ansammlungen nachweisen, in deren Umgebung aus ein- oder mehrkernigen Phagozyten gebildete Granulome entstanden waren. Für diese Fälle war ferner gemeinsam, dass in allen »periphere Füllung« eingetreten war, mit anderen Worten, dass Kontrastmittel bis in die terminalen Bronchiolen vorgedrungen war. Nach Ansicht der Verfasser lässt sich diese Erscheinung bei richtiger Injektionstechnik vermeiden.

Hess (1954) stellte in 19 histologisch untersuchten Lungen CMC-Reste und Fremdkörpergranulombildung fest. Die Bronchographie lag hier 4 Tage bis 4 Jahre zurück und war mit Ausnahme eines Falles, wo Umbradil-Viskös B benutzt worden war, mit Joduron B durchgeführt worden.

Norris und Stauffer (1954) haben bei 87 Bronchographien Dionosil Aqueous benutzt, ohne dass Nebenerscheinungen aufgetreten wären. Hierüber hat Stauffer (1954) persönlich mitgeteilt, dass man zahlreiche resezierte Lungen untersucht, jedoch keine Veränderungen habe feststellen können, die als durch CMC bedingt anzusehen wären.

Bessler (1955) hat mit Propyliodon-Cilag 100 Bronchographien ohne nennenswerte Nebenerscheinungen ausgeführt.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Wie aus den obigen Ausführungen hervorgeht, hat man seit 1948 in immer grösserem Ausmass begonnen zur Bronchographie an Stelle von ölhaltigen Kontrastmitteln wasserlösliche zu benutzen, die zur Erlangung der notwendigen Viskosität CMC (Karbomethylzellulose) enthalten. Verschiedenen Orts hat man sowohl durch Tierversuche als auch mit Hilfe klinischen Materials die durch CMC möglicherweise verursachten Lungenveränderungen zu klären versucht, aber die erhaltenen Ergebnisse widersprechen einander. Einerseits wird nämlich behauptet, dass CMC schnell aus dem Lungengewebe resorbiert wurde, ohne dass sie eine Reaktion verursache, oder dass sie höchstens schnell vorübergehende Veränderungen hervorrufe. Andererseits behauptet man, dass CMC sogar nach vier Jahren noch in den Lungen nachzuweisen sei und dass sie gleichzeitig eine langdauernde, bleibende Gewebsreaktion u.a. Granulombildung verursache. Man hat auch geäussert, dass zwischen den verschiedenen CMC-Fabrikaten Unterschiede hinsichtlich der durch sie bedingten Lungenveränderungen bestünden.

Da man auf Grund umfangreicher Erfahrung die schädlichen Nebenwirkungen der ölhaltigen Kontrastmittel erkannt hat, ist man fortlaufend bestrebt gewesen, neue, bessere Kontrastmittelvehikel zu finden, und da man in der Karbomethylzellulose einen hierfür geeigneten Stoff gefunden zu haben meint, sind die dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen ausgeführt worden, um die Eigenschaften dieses Stoffes an Tiermaterial zu erproben. Dabei wurden folgende Fragen über die in die Lungen der Versuchstiere eingebrachte CMC zu klären versucht.

1. Wie lange lässt sich CMC im Lungengewebe nachweisen,
2. werden durch CMC Gewebsreaktionen in der Lunge hervorgerufen, wenn ja,

3. welcher Art sind diese Reaktionen,
4. sind die Veränderungen von der Menge und Viskosität der benutzten CMC-Lösung abhängig, und
5. lässt sich eine Beeinträchtigung der Lungenfunktion durch diese Veränderungen feststellen?

#### INTRATRACHEAL (-BRONCHIAL) INJIZIERTE STOFFE

Für die Kontrollversuche wurde sterile physiologische Kochsalzlösung verwendet, welche von der Arzneimittelfabrik Orion hergestellt wurde.

Die Arzneimittelfabrik Astra lieferte die für die Versuche verwandte CMC und machte folgende Angaben über den Stoff:

- Ascherückstand zwischen 12 % und 16 %
- Feuchtigkeitsgehalt weniger als 10 %
- Viskosität einer daraus hergestellten 2 % igen Lösung zwischen 200 und 700 cp.

Die Versuchstiere erhielten drei in Bezug auf die Viskosität unterschiedliche Lösungen injiziert. Die Viskositäten dieser Lösungen waren, mit dem Ubbelohde-Viskositätsmesser bestimmt, bei 37°C 5, 10, und 30 mal grösser als die Viskosität von destilliertem Wasser. Der CMC-Gehalt der Lösungen betrug entsprechend 0,8; 1,05; und 1,55 Gew. %. Als Lösungsmittel wurde sterile physiologische Kochsalzlösungen verwandt, und da CMC sich langsam löst, wurde die Lösung jeweils einen Tag vor Verwendung hergestellt. Die fertigen Lösungen waren ganz klar. Die CMC wurde sterilisiert, indem sie vor dem Lösen 2 Stunden lang bei 120 °C im Heissluftsterilisator gehalten wurde. Die oben erwähnten Viskositätsbestimmungen wurden auch mit bereits sterilisierter CMC durchgeführt.

Als Versuchstiere wurden Ratten benutzt. Sowohl von der Kochsalzlösung als auch der CMC-Lösung wurden sowohl 0,1 ccm als auch 0,2 ccm/100 g Körpergewicht injiziert.

#### TECHNIK DER INTRATRACHEALEN (-BRONCHIALEN) INJEKTION

Um die Durchführung zu erleichtern, erhielten die Ratten im Ätherrausch 0,02 g Evipan-Natrium/100 g Körpergewicht

intraperitoneal injiziert, wodurch eine durchschnittlich eine Stunde dauernde tiefe Narkose erreicht wurde, sodass eine Anästhesierung der Schleimhaut des Schlundes und Kehlkopfes nicht erforderlich war.

Bei der eigentlichen intratrachealen (-bronchialen) Injektion wurde hauptsächlich die blutlose Technik nach Nungester und Jourdonais (1935) befolgt, welche mit Hilfe der Laryngoskopie durchgeführt wird und somit keine Tracheotomie erfordert. Das narkotisierte Tier wurde an den Extremitäten rücklings auf eine Unterlage festgebunden. Durch eine zwischen die Inzisiven des Ober- und Unterkiefers eingefügte, aus Stahldraht angefertigte Feder wurde eine maximale Öffnung des Maules erreicht, die Zunge liess sich mittels einer kleinen Klemme heraus und nach der Seite ziehen. Hiernach waren Kehldeckel und Stimmbänder mit Hilfe eines Ohrenspiegels direkt sichtbar und zwischen den Stimmbändern hindurch liess sich eine dünne Metallkanüle in die Trachea einführen. Es wurde eine 7 cm lange Kanüle benutzt, äusserer Durchmesser 2,5 mm, innerer 1,6 mm, welche ausserdem einen  $1\frac{1}{2}$  cm oberhalb des distalen Endes eine Krümmung von  $15^\circ$  aufwies. Am proximalen Ende befand sich seitlich, mit der Kanüle einen rechten Winkel bildend, ein kleiner Handgriff. Wenn die Kanüle richtig eingeführt war, befand sich ihr distales Ende ungefähr 1 bis 1,5 cm unterhalb der Stimmbänder in der Trachea und die Atmung erfolgte recht gut durch sie hindurch. Beim Einführen der Kanüle in die Trachea berührte die Spitze manchmal den Kehldeckel oder einen anderen Teil des Kehlkopfes und gelangte durch den dadurch ausgelösten Schluckreflex in den Oesophagus. Nungester und Jourdonais empfehlen zur Prüfung der richtigen Lagerung der Kanüle das Einbringen einiger Tropfen Seifenlösung in die proximale Öffnung, da dabei entstehende Bläschen die intratracheale Lagerung beweisen. Da hierbei jedoch die Möglichkeit einer Aspiration von Seifenwasser besteht, erfolgte die Kontrolle, indem im Augenblick der maximalen Inspiration die proximale Öffnung der Kanüle verschlossen wurde. Befand sich die Kanüle in der Trachea, so wurde hierdurch dem Tier die Expiration unmöglich gemacht.

Hiernach wurde durch die Kanüle ein 1,5 mm dicker steriler Ureterenkatheter möglichst vorsichtig hindurchgeschoben, bis

der durch die Bronchien gebildete Widerstand fühlbar wurde, vorauf der Katheter ungefähr 1—1,5 cm zurückgezogen wurde. Wegen seines kleineren Durchmessers liess sich der Katheter nahezu reibungslos in der Kanüle verschieben, sodass der von den Bronchien gebotene Widerstand leicht zu fühlen war. Bei einer besonderen Prüfung der Vulnerabilität des Lungengewebes in diesem Zusammenhang ergab sich, dass eine Verletzung der Lunge (z.B. Perforation der Lunge) bereits erhebliche Gewaltanwendung erforderte.

Sobald der Katheter richtig gelagert war, wurde mit ihr eine 1 ccm Tuberkulinspritze verbunden, mit der im Verlauf von 3 bis 4 Sekunden die erforderliche Lösungsmenge injiziert wurde. Vor der Injektion war das Kopfende der Unterlage um  $45^\circ$  gehoben worden. Der Verschluss des Katheters durch die Kanüle wurde von den Tieren gut ertragen, in einem eigens zu diesem Zweck vorgenommenen Versuch sogar 15 Sekunden lang.

Nach erfolgter Injektion wurden Katheter und Kanüle entfernt, und das Tier wurde für die restliche Dauer der Narkose, für nahezu eine Stunde senkrecht, mit dem Kopf nach oben aufgehängt.

Dank der verhältnismässig langen Injektionszeit wurden für die Injektion kein besonderer Druck benötigt. Der angewandte Druck wurde durch das minimale Katheterlumen noch erheblich vermindert, so dass bei Erprobung der Spritze mit angefügtem Katheter ausserhalb des Tieres unter Verwendung von physiologischer Kochsalzlösung, trotz kräftigen und schnell ausgeübten Druckes auf den Kolben die Lösung nur langsam, tropfenweise aus dem distalen Ende herausfloss.

Um die Katheterspitze im Augenblick der Injektion zu lokalisieren wurde auch eine Röntgenaufnahme gemacht. Da nur ein Krankenhausröntgenapparat zur Verfügung stand, dessen kleinster Effekt, da es sich um Ratten handelte, noch viel zu gross war, wurden die Folien aus den Filmkassetten fortgelassen. Mit einer Fokulentfernung von 78 cm, mit 45 kV und 450 mA sowie mit einer Belichtungszeit von 0,06 Sek. wurde ein Thoraxbild erhalten, in welchem Herz und Katheter gut sichtbar waren, dagegen waren Lungenparenchym und die injizierte Lösung nicht zu erkennen. Eine genaue Lokalisation war somit

schwer, und besonders in den Fällen, wo der Katheter sich in der Mittellinie befand, war unmöglich zu entscheiden, ob seine Spitze noch in der Trachea oder möglicherweise schon im Bronchus des rechten Mediallappens war. Ausserdem zeigte die histologische Betrachtung, dass trotz einwandfreier einseitiger Lage des Katheters injizierter Stoff auch in verschiedenen Teilen der anderen Lungen gefunden werden konnte.

#### ÜBER DIE VERSUCHSTIERE UND DEREN EINTEILUNG

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden im ganzen 245 weisse Laboratoriumsratten aus dem Wistarstamm benutzt. Die Tiere waren zu Beginn der Versuche höchstens 3 Monate alt und ihr Gewicht lag zwischen 180 und 200 g, das mittlere Gewicht betrug nahezu 200 g.

Als Schutz gegen eine mögliche Infektion der Atemwege erhielt jede Ratte drei Tage lang vor dem Versuch sowie auch am Tage der Durchführung des Versuches 10.000 Einheiten Procainpenicillin sowie 0,025 g Dihydrostreptomycin/200 g Körpergewicht.

*Die Kontrollserie I* umfasste 17 Tiere und diente zur Orientierung über die histologische Anatomie der Lungen des benutzten Rattenstammes. Alle Tiere erhielten die obenerwähnte Antibiotikabehandlung und wurden narkotisiert. Diese Serie wurde in zwei Nebengruppen eingeteilt von denen

- a) 5 Ratten umfasste, bei denen kein intrachealer Eingriff vorgenommen wurde und
- b) 12 Ratten, bei denen zwar der Katheter eingeführt, aber keinerlei Lösung injiziert wurde. Von diesen 12 Ratten wurden jeweils 4 nach 1, 2 und 5 Tagen getötet.

*Die Kontrollserie II* bildeten 30 Ratten, denen sterile, physiologische Kochsalzlösung injiziert wurde. Hinsichtlich der injizierten Menge wurden zwei gleichgrosse Nebenserien unterschieden



- a) Tiere, denen 0,1 ccm/100 g Körpergewicht und
  - b) Tiere, denen 0,2 ccm/100 g Körpergewicht injiziert wurde.
- Aus beiden Nebenserien wurden jeweils 3 Tiere nach 1, 2, 5, 10 und 20 Tagen getötet.

*CMC-Lösung erhaltende Ratten* wurden in folgende Haupt- und Nebenserien eingeteilt:

- I. Hauptserie: Viskosität der CMC-Lösung 5 mal grösser als diejenige von Wasser.
  - a) — Nebenserie: Injizierte Menge 0,1 ccm/100 g Körpergewicht,
  - b) — Nebenserie: Injizierte Menge 0,2 ccm/100 g Körpergewicht.
- II. Hauptserie: Viskosität der CMC-Lösung 10 mal grösser als diejenige von Wasser.
  - a) — Nebenserie: Injizierte Menge 0,1 ccm/100 g Körpergewicht,
  - b) — Nebenserie: Injizierte Menge 0,2 ccm/100 g Körpergewicht.
- III. Hauptserie: Viskosität der CMC-Lösung 30 mal grösser als diejenige von Wasser.
  - a) — Nebenserie: Injizierte Menge 0,1 ccm/100 g Körpergewicht,
  - b) — Nebenserie: Injizierte Menge 0,2 ccm/100 g Körpergewicht.

Jeder Nebenserie gehörten 33 Ratten an, von denen jeweils 3 Tiere nach 1, 2, 5, 10, 20, 30, 50 und 70 Tagen und nach 5, 8 und 12 Monaten getötet wurden. Dies geschah, indem entweder unverdünnte Formol in das verlängerte Rückenmark injiziert oder indem dies mit der Schere durchtrennt wurde. Der Brustkorb wurde erst geöffnet, wenn die Trachea ligiert worden war.

#### BAKTERIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG

Um im Lungengewebe möglicherweise auftretende Bakterien nachzuweisen, wurden beim Öffnen des Brustkorbes von insge-



samt 12 Ratten, die CMC erhalten hatten, Proben aus dem Lungenparenchym entnommen und auf Bakterien untersucht. Als Nährböden wurden Blutagar und Bouillon benutzt. Die Entnahme der Proben erfolgte, indem die Lungenoberfläche an einer Stelle mit einem glühenden Messer gebrannt wurde. In diesem Bereich wurde mit einem sterilen Messer ein kleiner Einschnitt gemacht, aus der die Probe mit einer ausgeglühten Platinöse entnommen wurde. In sämtlichen Fällen wurden Proben aus beiden Lungen entnommen und zwar aus 2 Ratten, die nach 1 Tag, aus 3 Ratten, die nach 2 Tagen, aus 2 Ratten, die nach 5 Tagen sowie aus je einer Ratte, die nach 10, 20, 30, 50 und 70 Tagen getötet worden waren. Aus den gleichen Tieren entnommene histologische Präparate wurden auch nach Gram auf Bakterien gefärbt, ausserdem auch aus zwei nach 5, 8 und 12 Monaten getöteten Ratten oder in ganzen aus 18 Ratten.

#### HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGSTECHNIK

Die Lungenstücke wurden durch 2—3 tägige Aufbewahrung in Formalinlösung (1 Teil gesättigte Formalinlösung und 9 Teile Wasser) fixiert. Nach Behandlung mit Alkohol, Methylbenzoat sowie Benzol und Benzolparaffin wurden sie in Paraffin eingebettet. In vorbereitenden Untersuchungen war festgestellt worden, dass CMC sich nicht in den oben erwähnten Stoffen löst, wie auch in Fachbüchern angegeben wird. Von jeder Ratte wurden der untere Abschnitt der Trachea, der rechte obere, mittlere, untere und mediane Lungenlobus sowie der obere, mittlere und untere Teil der linken Lunge jedes für sich auf einem Block befestigt und in verschiedenem Niveau  $4\ \mu$  dick geschnitten.

Folgende Färbungen wurden benutzt:

Haematoxylin-Eosin

Haematoxylin (Weigert) — v. Gieson

Toluidinblaufärbung

Perjodat-Leukofuchsinfärbung (nach McManus)

Bakterienfärbung nach Gram.

ALLGEMEINES ÜBER DIE ANATOMIE DER ATMUNGSORGANE  
DER RATTE

Kaninchen, Ratte, Maus und Meerschweinchen, die alle zu den Nagetieren gezählt werden, sind die in der medizinischen Forschung am häufigsten benutzten Versuchstiere. In Bezug auf die normale Anatomie der Atmungsorgane ist bei den drei erstgenannten eine deutliche Übereinstimmung festzustellen. Dies trifft in noch grösserem Umfang auf Ratte und Maus zu. Das Meerschweinchen dagegen weicht hiervon in mancher Beziehung ab, besonders was die Menge des lymphatischen Gewebes, dessen topographische Verteilung und Reaktionen sowie den Bau der Lungenarterien betrifft.

Im Folgenden werden einige für die Atmungsorgane der Ratte charakteristische Tatsachen aufgezählt. Das Epithel der Trachea besteht aus zweireihigem Flimmerepithel. In den grösseren Bronchien findet sich ein mehrreihiges Flimmerepithel mit einigen Becherzellen hier und da. Beim Kleinerwerden des Durchmessers der Bronchien flacht das Epithel ab, geht zunächst in ein einreihiges Zylinderepithel über und dann in ein kubisches Epithel ohne Flimmersaum; gleichzeitig nimmt die Zahl der Becherzellen ab. In den kleineren Bronchien und Bronchiolen fehlen die in der Wand gelegenen Schleimdrüsen völlig. In der Wandung der intrapulmonalen Bronchien wird kein Knorpel angetroffen. In der Wand der Bronchien, besonders im Bereich der Verzweigungen, findet man reichlich Lymphknoten, deren Anzahl und Grösse erheblich variiert. In dieser Beziehung werden Unterschiede nicht nur zwischen einzelnen Tieren, sondern auch beim selben Tier in Abhängigkeit von dem jeweiligen Reizungszustand im betreffenden Lungengebiet gefunden. Im Bereich der Lymphknoten werden in der Wandung der Bronchien keine sonst in grosser Zahl vorhandene elastische Fasern angetroffen. Die in der Wand gelegenen Lymphknoten können sich sogar derart vergrössern, dass sie durch die verschiedenen Schichten der Wand reichen, und entsprechend können die peribronchialen Lymphknoten in bestimmten Reizzuständen geschlossene ring- oder mantelförmige Gebilde um die Bronchien bilden.

Die rechte Lunge ist bei der Ratte grösser als die linke und

setzt sich aus einem Ober-, Mittel-, Unter- und Mediallappen zusammen, die linke Lunge dagegen besteht nur aus einem einzigen Lobus. In der Lunge der Ratte, wie auch bei anderen Nagetieren, wird keine Lobulusstruktur gefunden. Die Zweigung der Bronchien erfolgt bei der Ratte in gleicher Weise wie beim Menschen. Jeder Bronchiolus verzweigt sich in zwei manchmal auch in drei terminale Bronchiolen und diese wiederum in respiratorische Bronchiolen. Für die terminalen Bronchiolen ist das Fehlen von Becherzellen in deren Epithel charakteristisch. In den respiratorischen Bronchiolen werden bereits Alveolen angetroffen, die auf der Seite der neben den Bronchiolen verlaufenden Pulmonalarterien gelegen sind. Die respiratorischen Bronchiolen enden oft in Alveolärgänge (Ductus alveolares), die als Atrium bezeichnet werden und aus denen wiederum die Alveolarsäckchen (Infundibulae) entspringen.

Die Alveolarsepten der Ratte sind wie die anderer Nagetiere verhältnismässig dicker als beim Menschen. Teilweise ist dies scheinbar, da der Durchmesser der Kapillaren im Vergleich zum Durchmesser der Alveolen auch grösser ist. Teilweise sind sie auch deshalb dicker, weil in ihnen wie in den Alveolarsepten sämtlicher Nagetiere reichlich lymphoide und leukozytäre Zellen angetroffen werden (Gerlach und Finkeldey, 1926). Die Zahl der elastischen Fasern in den Alveolarsepten entspricht ungefähr der bei Mäusen und Menschen gefundenen. Die Alveolen einer gesunden Ratte sind gewöhnlich frei von jeglichem fremden Inhalt.

In der Wand der Lungenvenen findet sich von Herzen ab eine ringförmige Muskelschicht, welche sämtliche Eigenschaften der quergestreiften Herzmuskulatur aufweist. In den Lungenarterien dagegen kommt eine im Vergleich zu den Lungenarterien beim Menschen sehr dicke Muskelschicht vor. Der Blutgehalt der Lungen scheint von der Tötungsart — Schlag in den Nacken, Öffnen der Halsschlagadern oder Äthernarkose — unabhängig zu sein (Lauche, 1931).

Das Lymphgefässsystem des Lungenparenchyms der Ratte ist ziemlich stark ausgebildet und umgibt allseitig Bronchien und Blutgefässe. Die Lymphgefässe entspringen in den Alveolarsepten. Bei der gesunden Ratte werden bei der histologischen Untersuchung im allgemeinen keine Lymphgefässe beobachtet,

aber z.B. bei Vorliegen einer Entzündung kann ihr Lumen sichtbar werden. Weiter oben wurde bereits auf die grosse reaktive Veränderlichkeit des lymphatischen Gewebes hingewiesen. Lauche (1931) warnt geradezu davor, Nagetiere für solche Versuche zu verwenden, in denen Beurteilung der Reaktion des lymphatischen Gewebes eine entscheidende Rolle spielt.

## ERGEBNISSE

### STERBLICHKEIT DER TIERE

Bei Durchführung des intratrachealen (-bronchialen) Eingriffs starb keins der Versuchstiere in Folge von Suffokation oder irgendetwas Ähnlichem. Ein Grund hierfür war wahrscheinlich das Herausziehen und Fixieren der Zunge für die Dauer der Narkose, denn beim Üben der Injektionstechnik hatte sich gezeigt, dass die Zunge während der Narkose leicht in den Schlund absinken und so zur Erstickung führen kann.

### BAKTERIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG

Aus den 12 entnommenen Proben liessen sich in keinem Fall Bakterien züchten. In gleicher Weise fiel das Ergebnis der bei 18 Tieren durchgeführten Färbung des histologischen Präparates nach Gram in Bezug auf Bakterien negativ aus. Jones (1922) hat als Ergebnis einer Untersuchung, welche Kaninchen, Meer-schweinchen, Ratten und Mäuse umfasste, ebenfalls behauptet, dass das eigentliche Lungengewebe dieser Tiere fast immer steril ist.

### MAKROSKOPISCHE BETRACHTUNG DER LUNGEN UND HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG

#### *Kontrollserie I.*

Die Lungen aller 17 Ratten, sowohl die der normalen, intakten als auch die derjenigen Tiere, bei denen die Katherisierung durchgeführt, wiesen beim Öffnen des Brustkorbes die normale blassrote Färbung auf.

Die histologische Untersuchung ergab, dass in sämtlichen Fällen Trachea, Bronchien und Bronchiolen frei waren. Nur in ein paar Fällen konnten in einem grösseren Bronchus kleine, von desquamierten Epithelzellen gebildete Gruppen nachgewiesen werden. In Hinsicht auf den Blutgehalt des Lungengewebes bestanden Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren in erster Linie zwischen den perihilären und peribronchialen Gebieten der Lunge oder des Lungenlappens. Ausserdem konnte beim selben Tier der Blutgehalt der peribronchialen Gebiete deutlich grösser sein als der von peripheren Teilen. An den Stellen, wo der Blutgehalt erhöht war, waren die Alveolarsepten dicker als gewöhnlich, verliefen geschlängelt, und die Alveolen wirkten kleiner. Unabhängig vom Blutgehalt waren von den Elementen der Alveolarsepten die verhältnismässig grosskernigen Septalzellen überall deutlich sichtbar, stellenweise sich sogar in das Lumen der Alveolen vorbuchtend. Allgemein fanden sich nur ein paar einzelne grosse, mononukleäre Makrophagen in jedem Präparat. In den Alveolen war kein fremder Inhalt festzustellen, (Abb.: 1.), weder nach Toluidinblau, noch nach Perjodat—Leukofuchsinfärbung.

Bei den 12 Ratten, die nur »kathetrisiert« worden waren, hatte der Katheter sich auf Grund der Röntgenaufnahmen in drei Fällen im unteren Teil der rechten Lunge befunden, in zwei Fällen möglicherweise in der Trachea oder im rechten Mittellappen sowie in sieben Fällen im unteren Teil der linken Lunge. Wie schon erwähnt, fanden sich bei der makroskopischen Betrachtung keine Zeichen einer Perforation oder irgendeiner anderen Läsion. Diejenigen Lungenteile, mit denen der Katheter wahrscheinlich in Berührung gekommen war, wurden besonders genau histologisch untersucht, um möglicherweise eingetretene entzündliche Veränderungen und mechanische Verletzungen u.a. Blutungen ausfindig zu machen. Es gelang jedoch in keinem Fall, irgendetwas Derartiges, vom Normalen abweichendes, festzustellen.

*Kontrollserie II.* (Ratten, die physiologische Kochsalzlösung erhalten hatten).

a) — Nebenserie. Injizierte Menge 0,1 ccm/100 g Körpergewicht.

*Nach einem Tag* fanden sich bei zwei getöten Tieren normal

gefärbte Lungen vor, aber die Lunge der dritten Ratte war durchweg rötlicher als gewöhnlich. Bei der histologischen Untersuchung waren Trachea, Bronchien und Bronchiolen aller Tiere frei, und weder im Epithel noch im darunterliegenden Gewebe konnten entzündliche Veränderungen festgestellt werden. Der Blutgehalt des Lungengewebes musste bei einer Ratte für normal angesehen werden, dagegen fanden sich im unteren Teil der linken Lunge, wo auch der Katheter sich befunden hatte, wandständig in den Alveolen aussergewöhnlich reichlich grosse, mononukleäre Makrophagen. Diese schienen zwar weder fremden Stoff, noch irgendwelche Partikel zu enthalten. Der Blutgehalt der beiden anderen Rattenlungen war im Vergleich zu dem Kontrolltiere deutlich erhöht, besonders im kaudalen Teil. Hyperämie fand sich nur in perihilären und in peribronchialen Teilen, besonders stark bei dem schon bei der Inspektion aufgefallenen Tier, reichte auch hier jedoch nicht bis in die Peripherie. Die Alveolarsepten waren an diesen Stellen verdickt, der alveoläre Aufbau des Lungenparenchyms war jedoch deutlich erhalten. Zeichen eines perivaskulären Ödems waren nicht feststellbar.

*Nach zwei Tagen* wiesen sämtliche Rattenlungen noch eine etwas rötlichere Farbe auf als gewöhnlich. Die mikroskopische Untersuchung zeigte bei allen noch vorhandene Kongestion, aber diese erschien geringer als die bei den am vorhergehenden Tage getöteten Tieren. Die Anzahl der grossen mononukleären Makrophagen schien nicht zugenommen zu haben. In den Atemgängen und Alveolen konnte kein fremder Inhalt nachgewiesen werden.

*Nach fünf Tagen* stimmte die Farbe der Lungen bei allen Tieren mit der von Kontrolltieren überein, und die mikroskopische Untersuchung ergab das gleiche Bild.

*Nach zehn Tagen* war der Befund derselbe wie bei Kontrolltieren. Als einzige Ausnahme fand sich bei zwei Ratten im Lumen des Hauptbronchus an der Stelle, wo der Katheter sich wahrscheinlich befunden hatte, eine von ein paar Granulozyten gebildete Gruppe.

*Zwanzig Tage später* war der Befund ebenfalls der gleiche wie bei Kontrolltieren. Die Bindegewebsfärbung ergab keine Zu-



nahme des Bindegewebes im Lungenparenchym im Vergleich zu den Kontrolltieren.

b) — Nebenserie. Injizierte Menge 0,2 ccm/100 g Körpergewicht.

*Nach einem Tag* war die Farbe der Lungen bei allen Tieren rötlicher als gewöhnlich. Trachea, Bronchien und Bronchiolen waren überall frei. Der Blutgehalt der Lungen war bei allen drei Tieren grösser als normal und ausser im kaudalen Bereich der Lungen besonders deutlich auch im rechten Mittellappen, und erstreckte sich überall weiter in die Peripherie als bei den Tieren der a)-Nebenserie. Die Alveolarsepten waren übereinstimmend blutreich und verdickt, aber Blutkörperchenextravasat oder Ödem liessen sich nicht feststellen. In den Alveolen war weder nach der Toluidinblau — noch nach der Perjodat-Leukofuchsinfärbung fremder Inhalt sichtbar. Die Zahl der mononukleären Makrophagen schien nicht zugenommen zu haben, auch die Grösse der septalen Zellen war anscheinend unverändert. Im eigentlichen Lungenparenchym wurden keine Granulozyten gefunden. Abb.: 2.

*Nach zwei Tagen* war die Lungenfärbung noch bei allen drei Ratten rötlicher als gewöhnlich. Der histologische Befund entsprach ungefähr dem Zustand am vorhergehenden Tage, und auch der Blutgehalt war ungefähr gleich. Bei einer Ratte war die Hyperämie ausnahmsweise auf den mittleren und unteren Teil der linken Lunge begrenzt, wo auch der Katheter sich befunden hatte.

*Nach fünf Tagen* sahen alle Lungen wieder wie normal aus. Nur in einem Fall übertraf bei der histologischen Untersuchung die Blutfülle das Ausmass der bei Kontrolltieren üblichen, und umfasste sowohl die mittleren als auch kaudalen Anteile, schien jedoch schwächer zu sein als bei nach zwei Tagen getöteten Ratten.

*Nach zehn und zwanzig Tagen* war der Befund mit dem von Kontrolltieren identisch. Reaktive Veränderungen konnten nicht nachgewiesen werden.

*Zusammenfassend* kann über die durch physiologische Kochsalzlösung hervorgerufenen Veränderungen gesagt werden, dass der bemerkenswerteste Befund eine vorübergehende, reaktive Hyperämie des Lungengewebes ist, welche im histologischen



Bild vor allem als Verdickung der Alveolarsepten und als Kongestion erscheint. Hyperämie trat bei den Ratten, welche die kleinere Menge Kochsalzlösung erhalten hatte, in perihilären und peribronchialen Gebieten der kaudalen Teile bei der Lungen auf, aber bei den Ratten, welche die grössere Menge erhalten, ausserdem im mittleren Bereich der Lunge, sich gleichzeitig auch weiter in die Peripherie erstreckend. Nur in einem Fall schien die Hyperämie sich lediglich auf die linke Lunge zu beschränken, in der sich der Katheter befunden hatte. In beiden Nebenserien erreichte die Veränderungen nach 1 bis 2 Tagen ihren Höhengpunkt, und fünf Tage später war der Befund derselbe wie bei Kontrolltieren, mit Ausnahme einer Ratte, welche die grössere Menge erhalten hatte und bei der noch am diesem Zeitpunkt eine schwache Hyperämie vorlag. Nach Verlauf von 10 und 20 Tagen war der Befund in jeder Hinsicht normal. In keiner Phase war allgemeine Makrophagenreaktion zu beobachten, ausser in einem Fall, wo die Zahl der grossen, mononukleären Makrophagen etwas angestiegen war, jedoch auf begrenztem Gebiet. Fremder Alveolarinhalt wurde nicht beobachtet. Trachea, Bronchien und Bronchiolen sämtlicher Tiere waren frei, auch nach der Toluidinblau- und Perjodat-Leukofuchsinfärbung.

#### CMC-RATTEN

I. Hauptserie: Viskosität der CMC-Lösung 5 mal grösser als die von Wasser.

a) — Nebenserie: Injizierte Menge 0,1 ccm/100 g Körpergewicht.

*Nach einem Tag* wirkten Färbung und Aussehen der Lungen sämtlicher Tiere normal. Aus der mikroskopischen Untersuchung ging hervor, dass in der Trachea kein fremder Inhalt vorlag, dass aber sogar in den grössten Bronchien sowie in den Bronchiolen, mit Ausnahme der Atemgänge in den kranialen Anteilen der Lungen, hier und da als verstreute Tropfen ein Stoff vorhanden war, welcher mit Hämatoxylineosin sich deutlich hellblau anfärbte, mit Toluidinblau metachromatisch, aber mit Perjodat-I eukofuchsinpraktisch überhaupt nicht (Abb.: 3), sodass man ihn für CMC halten muss. Auch in den Alveolen fand sich

CMC in Form von Tröpfchen und besonders in dem Bereich, wo die Injektion erfolgt war, bildeten derartige Alveolen sogar grosse, einheitliche, vor allem peribronchiale und subpleurale Gebiete. Die Alveolen der kranialen Lungenteile enthielten kein CMC. Die Alveolen derjenigen kaudalen Lungenteile, in denen der Katheter sich nicht befunden hatte, enthielten weniger CMC. In den Atemgängen und Alveolen fanden sich neben CMC einige wenige makrophagenartige Zellen, deren Inhalt sich mit Toluidinblau nicht metachromatisch anfärbte. Der Blutgehalt der Alveolarsepten schien besonders in den CMC-haltigen Lungenteilen vermehrt zu sein, jedoch nicht augenfällig reichlicher als bei Kontrolltieren. Der Inhalt der Septumzellen färbte sich nicht metachromatisch. Auch in peripheren oder zentralen Lymphknoten wurde kein sich metachromatisch anfärbender Inhalt beobachtet.

*Nach zwei Tagen* waren die Lungen aller getöteten Ratten rötlicher als gewöhnlich. Der mikroskopische Befund der Bronchien und Bronchiolen wich nur insofern von dem vortägigen Befund ab, dass die Zahl der Makrophagen grösser erschien. Im Bereich grosser, einheitlicher Gebiete, welche die grössten Bronchien der injizierten Lungenteile umgaben und bis zu  $\frac{1}{3}$  bis  $\frac{1}{2}$  der durchschnittlichen Lungenfläche ausmachten (Abb.: 4.), waren die Alveolen fast völlig von grossen, mononukleären, teilweise Vakuolen enthaltenden Makrophagen ausgefüllt, und in den Alveolen war fast gar keine freie CMC zu sehen. Die Färbung ergab, dass die Makrophagen bereits CMC enthielten, die in gleicher Weise sowohl in den peripheren als auch zentralen Lymphknoten nachzuweisen war. Ausserdem enthielten (Abb.: 4.) die Alveolen Granulozyten und auch Rundzellen, aber erheblich weniger als Makrophagen. Der Blutgehalt der Lungen war merkbar erhöht. Er entsprach ungefähr dem derjenigen Ratten, die physiologische Kochsalzlösung erhalten und zur selben Zeit getötet worden waren, und war am auffälligsten in jenem Bereich, wo eine starke Makrophagenreaktion vorlag. Stellenweise waren die Septumzellen geschwollen, und nach der Färbung zu urteilen, enthielten auch sie spärlich CMC. In denjenigen Lungenanteilen, wo der Katheter sich nicht befunden hatte und wo deshalb weniger CMC vorhanden war, war auch die Makrophagenreaktion geringer.

*Nach fünf Tagen* wirkte die Farbe der Lungen normal, aber der kaudalste Teil der linken Lunge einer Ratte war bis ungefähr 1 cm hoch grauer als gewöhnlich und schien fester zu sein als die übrige Lunge. Der mikroskopische Befund der injizierten und kaudalen Lungenteile der beiden anderen Ratten entsprach ungefähr dem Befund der vorhergehenden Gruppe; die Zahl der Makrophagen in Bronchien und Bronchiolen schien zugenommen zu haben, aber in den Alveolen dagegen waren deutlich weniger Granulozyten. Der Blutgehalt des Lungengewebes näherte sich wieder normalen Werten.

Dagegen wich der histologische Befund des Lungenteiles der schon bei der Inspektion aufgefallenen Ratte von den anderen ab. In den Bronchien fanden sich reichlich grosse von zum Teil schon im Zerfall befindlichen Granulozyten gebildete Gruppen. Im Bronchialepithel waren stellenweise Anzeichen von Nekrotisierung, und das peribronchiale Gewebe war atelektatisch; nur in subpleuralen Gebieten waren hinsichtlich des Luftgehaltes nahezu normal anmutende Alveolen. In den atelektatischen Teilen fanden sich reichlich CMC und Makrophagen. Ausserdem waren in den Alveolen verhältnismässig reichlich Granulozyten und Rundzellen vorhanden, jedoch weniger als Makrophagen. Peribronchiale Eiterzellinfiltration war in geringem Ausmass feststellbar.

*Nach zehn Tagen* war der makroskopische Befund der gleiche wie bei intakten Kontrolltieren. Neben Makrophagen waren auch die intraalveolären Granulozyten und Rundzellen verschwunden; (Abb.: 6.) sonst war der Zustand ungefähr der gleiche wie beiden beiden zuerst beschriebenen Tieren der vorhergehenden Gruppe.

Bei den *nach zwanzig Tagen* getöteten Tieren hatte der Katheter sich im kaudalen Teil der linken Lunge befunden. In den Bronchien und Bronchiolen konnte man keine CMC sehen. In zwei Fällen war ungefähr die Hälfte der im Präparat sichtbaren Alveolen an dieser Stelle völlig von Makrophagen ausgefüllt. Stellenweise waren in den Alveolen ausserdem CMC-Tröpfchen zu sehen. Im dritten Fall kamen die Makrophagen in den Alveolen zum grössten Teil wandständig vor.

*Nach dreissig Tagen* fanden sich weiterhin besonders in den injizierten Teilen auch ausgedehnte, einheitliche Gebiete, deren

Alveolen reichlich Makrophagen sowie spärlich CMC-Tröpfchen enthielten. Unter den Makrophagen gab es zahlreiche kernlose, im Zerfall befindliche, und ausserdem war in ihnen vermehrte Vakuolenbildung und reichlicherer Partikelinhalt zu beobachten.

Bei den *nach fünfzig Tagen* getöteten Ratten wich die Lunge einer Ratte bei der äusseren Betrachtung insofern von den übrigen ab, dass der kaudalste Abschnitt der injizierten Lunge bis ungefähr 1 cm hoch hellgrau, fest und dicker als die übrige Lunge war. Das hiervon angefertigte mikroskopische Präparat zeigte einen grossen Hohlraum von fast der grösse des Präparates, in welchem sich grosse, von zum Teil autolysierten Granulozyten gebildete Massen befanden. Die Innenfläche des Hohlraums wurde teilweise vom intakten mehrreihigen, teilweise vom sich einreihig fortsetzenden Bronchialepithel bedeckt, zum Teil war überhaupt kein Epithel vorhanden. Den Hohlraum umgab von allen Seiten dichtes atelektatisches Lungengewebe. Lufthaltigere Alveolen waren nur in der Peripherie des Präparates sichtbar, und zwar vom Hohlraum aus gesehen, auf der vom Epithel bedeckten Seite. In den atelektatischen Gebieten waren besonders reichlich vakuolisierte Makrophagen, deren Inhalt sich metachromatisch anfärbte, und das Bindegewebe war dort merkbar vermehrt (Abb.: 7.). Im Lungenparenchym war keine nennenswerte Eiterzellinfiltration feststellbar. In dem Teil ohne Epithelschicht fielen besonders zahlreiche Granulombildungen auf, in denen neben zum Teil in Zerfall befindlichen Granulozyten und kollagenen Bindegewebsfasern ausserdem sich basophil anfärbende, Teilchen enthaltende, mehrkernige Riesenzellen sowie Plasmazellen vorhanden waren (Abb.: 8.). In den Bronchien des Mittelteiles derselben Lunge waren der einzige erwähnenswerte Befund reichlich Granulozyten.

Von den zwei gleichzeitig getöteten Ratten fanden sich bei dem einen im unteren Teil der linken Lunge hier und dort einige Alveolen, in denen vor allem an den Septen entlang Makrophagen mit schwach metachromatisch sich anfärbendem Inhalt vorkamen. Bei der dritten Ratte fanden sich gleichartige Alveolen im kaudalen Abschnitt beider Lungen.

*Nach siebzig Tagen* war der kaudalste Teil der injizierten Lunge bei einer Ratte, von den anderen abweichend, glasig grau und fest. In diesem Bereich enthielten die Bronchien kleine Granulo-

zytengruppen. Im Epithel eines Bronchus fanden sich schwache Anzeichen von Nekrotisierung. Das die Bronchien unmittelbar umgebende sowie das zwischen ihnen gelegene Lungengewebe war stark atelektatisch. Weiter peripherwärts und subpleural waren reichlich zusammenhängende Alveolargruppen, in deren Alveolen sich sowohl CMC-Tröpfchen, als auch grosse, sich metachromatisch anfärbende, Vakuolen und Partikel enthaltende Makrophagen befanden. Stellenweise kamen auch reichlich schwächer angefärbte kernlose Makrophagen mit unscharfer Membran vor. Die Bronchiolen waren frei.

Im kaudalen Teil der Lungen der beiden anderen Ratten waren hier und dort kleine, von einigen Alveolen gebildete Gruppen, in deren Alveolen spärlich Makrophagen vorkamen, und ausserdem fand sich pro Präparat nur ein kleiner CMC-Tropfen irgendwo in einer Alveole.

*Nach fünf Monaten* bot die mikroskopische Untersuchung bei allen Tieren das gleiche Bild: In zwei Fällen im kaudalen Teil der linken Lunge und in einem Fall im Unterlappen der rechten Lunge waren ziemlich spärlich ungefähr 5 bis 10 kleine Gruppen von Alveolen, in denen noch in der Mehrzahl septumständige Makrophagen sichtbar waren. Diese Gruppen fanden sich vor allem in peribronchialen und subpleuralen Gebieten (Abb.: 9.). Das Protoplasma der Makrophagen war reichlich vakuolisiert und färbte sich schwach metachromatisch. Kleine sich ebenfalls metachromatisch anfärbende Ansammlungen von Partikeln waren sowohl in den subpleuralen Lymphbahnen als auch in peripheren und zentralen Lymphknoten der betreffenden Lungenteile zu sehen. In den Alveolen dagegen war keine freie CMC mehr vorhanden.

*Nach acht Monaten* fand man nur bei einer Ratte in der eine Lunge zwei kleine Alveolengruppen, in denen septumständige, ziemlich schwach metachromatisch sich anfärbende, vakuolierte Makrophagen vorkamen. In peripheren und zentralen Lymphbanen und Lymphknoten waren spärlich kleine metachromatisch sich anfärbende Partikelansammlungen sichtbar. Die histologische Untersuchung der Lungen der beiden anderen Ratten ergab einen normalen Befund. So konnte in deren Lymphbanen und Lymphknoten kein metachromatisch sich anfärbender Stoff nachgewiesen werden.

*Nach einem Jahr* entsprach der Lungenbefund bei zwei Ratten ungefähr dem Normalen. In den mittleren und kaudalen Teilen dieser Lungen waren hier und dort einige Makrophagen, deren Zahl jedoch nicht grösser als normal zu sein schien und deren Inhalt sich nicht eindeutig metachromatisch anfärbte.

Dagegen waren in den grössten Bronchien des rechten Medianlappens einer Ratte reichlich Granulozyten und ausserdem fanden sich dort wie auch im rechten Unterlappen einige Alveolengruppen, in denen neben zahlreichen Granulozyten teilweise im Zerfall befindliche Makrophagen mit metachromatisch sich anfärbendem Inhalt waren. In den Alveolarsepten kam Eiterzellinfiltration vor, und der Blutgehalt der Septen war vermehrt. Ein kleinerer Bronchus des Mittellappens der gleichen Lunge sowie einige terminale Bronchiolen enthielten besonders reichlich Granulozyten. Der Durchmesser des Bronchus und der Bronchiolen war deutlich grösser als normal (Abb. 10.), aber ihr Epithel erschien normal. Ausserdem war in vielen Bronchiolen entweder als homogene Masse oder als netzförmiges Flechtwerk ein Stoff vorhanden, der sich deutlich metachromatisch anfärbte, jedoch mit Perjodat-I eukofuchsin keine Farbreaktion gab und in dem sich im Zerfall befindliche Makrophagen und Granulozyten anfinden. Das die Bronchiolen umgebende Lungengewebe war atelektatisch, und die Zahl seiner Bindegewebsfasern hatte zugenommen und begann homogen zu werden. Ausserdem konnte man darin zahlreiche Fibrozyten, Mastzellen, deren körniger Inhalt sich metachromatisch anfärbte, sowie einige Fremdkörperriesenzellen beobachten.

b) — Nebenserie: Injizierte Menge 0,2 ccm/100 g Körpergewicht.

*Nach einem Tag* sahen die Lungen der getöteten Tiere rötlicher als gewöhnlich aus. Die mikroskopische Untersuchung ergab nur in der Trachea eines Tieres CMC-Tröpfchen, dagegen fand man diesen Stoff in den Bronchien und auch Bronchiolen nahezu jedes Lungenteiles. CMC-haltige Alveolen waren im rechten Ober- und Mittellappen am wenigsten vorhanden. In diesen fand sich CMC nur in einigen Alveolen pro Präparat. Zahlreicher waren derartige Alveolen im oberen Teil der linken Lunge und am zahlreichsten in den injizierten und kaudalen



Lungenteilen, d.h. in dem mittleren und unteren Teil der linken sowie im Median- und Unterlappen der rechten Lunge. Ihre Anzahl pro Präparat entsprach ungefähr der bei der a) — Nebenserie am selben Zeitpunkt festgestellten. In den Lungen sämtlicher Tiere war Hyperämie feststellbar. Die Septumzellen wirkten unverändert, und die Zahl der intraalveolaren Makrophagen war nicht eindeutig vergrössert; auch an den Stellen nicht, wo die Alveolen CMC enthielten. Auf Grund der Färbung enthielten weder die Makrophagen noch die peripheren oder zentralen Lymphknoten CMC.

*Nach zwei Tagen* fanden sich bei allen Tieren rötlichere Lungen als gewöhnlich. In der Trachea wies keins der Tiere fremden Inhalt auf, aber besonders in den grösseren Bronchien waren kleine CMC-Tropfen und in Verbindung damit spärlich Makrophagen und in einigen ausserdem kleine von Granulozyten gebildete Gruppen. Das topographische Auftreten CMC-haltiger Bronchiolen und Alveolen stimmte mit dem Befund der am Tage vorher getöten Tiere überein. Neben CMC enthielten Bronchiolen und Alveolen spärlich Makrophagen. In den Lungen aller Tiere wurde eine ziemlich starke Hyperämie beobachtet; die Alveolarsepten waren deshalb verdickt und geschlängelt. Ausserdem waren die Septumzellen stellenweise geschwollen und ins Alveolarlumen vorspringend. Auf Grund der schwach metachromatischen Färbung ihres Inhaltes sowie desjenigen der Makrophagen konnte man schliessen, dass beide bereits CMC enthielten. Dagegen konnte man in den Lymphknoten und -bahnen keinen sich so anfärbenden Inhalt feststellen.

*Nach fünf Tagen* sah die Farbe der Lungen sämtlicher Tiere praktisch normal aus. Sogar in den grösseren Bronchien der kaudalen Lungenabschnitte waren noch CMC-Tröpfchen, und noch reichlicher Makrophagen als zuvor. Die Zahl der in den Alveolen befindlichen Makrophagen war ebenfalls stark vermehrt; meistens waren die Alveolen damit ausgefüllt. Die Makrophagen wiesen zum Teil Vakuolen auf, und in einigen waren deutliche Körner. Es kamen auch kernlose Makrophagen vor. Die metachromatische Färbung der Makrophagen war intensiv; gleichfalls war offenbar, dass auch in den Lymphknoten und Lymphbahnen CMC vorhanden war. Der Blutge-

halt des Lungenparenchyms war nahezu normal, ebenso die Dicke der Alveolarsepten.

*Nach zehn Tagen* wirkte der makroskopische Befund normal. Bei keiner Ratte fand sich CMC in der Trachea oder in den grösseren Bronchien. In bezug auf die Alveolen war der Befund der gleiche wie bei der vorigen Gruppe. Unter den Makrophagen gab es jetzt möglicherweise mehr kernlose und mehr vakuolierte, und die metachromatische Färbbarkeit war besonders intensiv.

*Nach zwanzig Tagen* hatte die Menge der extrazellulären CMC in allen Lungenteilen abgenommen. So enthielten in zwei Fällen die kranialen Lungenteile und der rechte Mittellappen sie überhaupt nicht mehr. Die kaudalen Teile enthielten weniger CMC, aber es fanden sich dort weiterhin reichlich Makrophagen enthaltende Alveolen sogar in Form grösserer, zusammenhängender Gebiete

*Nach dreissig Tagen* waren sowohl im rechten Oberlappen als auch im oberen Anteil der linken Lunge aller Tiere noch einige kleine CMC-Tropfen vorhanden. Noch reichlicher fanden sie sich in kaudalen Anteilen und mehr in der Lunge, wo der Katheter sich befunden hatte. So waren im unteren Teil der linken Lunge einer Ratte umfangreiche, besonders peribronchiale Gebiete, in deren Alveolen sich weiterhin CMC und sehr reichlich Makrophagen befanden.

*Nach fünfzig Tagen* konnte man in der rechten Lunge einer Ratte überhaupt keine extrazelluläre CMC feststellen, bei der anderen war nur ein Tropfen im Oberlappen und bei der dritten war CMC in ungefähr 10 Alveolen des rechten Unterlappens vorhanden. CMC liess sich jedoch noch sogar in den Lymphknoten der rechtsseitigen kranialen Lungenlappen nachweisen. Im unteren Teil der linken Lunge waren noch immer verhältnismässig reichlich CMC und Makrophagen enthaltende Alveolen, und von den Makrophagen befanden sich einige in der Mitte eines CMC-Tropfens.

*Nach siebzig Tagen* war der Befund im Vergleich zu dem zuletzt beschriebenen ziemlich unverändert. Allerdings erschien die Zahl der in den Alveolen der kaudalen Teile vorhandenen Makrophagen etwas kleiner und an manchen Stellen fanden sie sich nur septumständig.



*Nach fünf Monaten* trat in den kranialen und mittleren Teilen nichts von Normalen abweichendes auf. Dagegen waren in den kaudalen Teilen pro Präparat ungefähr 2 bis 3 Alveolengruppen, in deren Alveolen einige CMC-Tropfen oder nur reichlich Makrophagen vorhanden waren.

*Nach acht Monaten* fanden sich als erwähnenswerter Befund in dem unteren Teil der injizierten Lunge bei einer Ratte im Zerfall befindliche Makrophagen enthaltende Alveolengruppen. Der Inhalt der Makrophagen färbte sich deutlich metachromatisch. Nirgends konnte Zunahme des Bindegewebes im Lungenparenchym festgestellt werden.

*Nach einem Jahr* entsprach das histologische Bild aller Tiere dem der intakten Kontrolltiere. Nur in den peripheren und zentralen Lymphknoten der kaudalen Lungenteile einer Ratte waren schwach metachromatisch sich anfärbende Partikeln.

**Z u s a m m e n f a s s e n d** kann über die in der I. Hauptgruppe aufgetretenen Lungenveränderungen gesagt werden, dass die in der Mehrzahl der Fälle festgestellten Veränderungen so beschaffen sind, dass man sie als eine mit der Resorption von CMC in Zusammenhang stehende, regelmässige Reaktion ansehen muss.

Die bei der Lungeninspektion beobachteten Farbveränderungen wiesen auf Hyperämie des Lungengewebes hin und stimmten mit dem histologischen Befund überein. Sowohl in der a)- als auch b)- Nebenserie war bereits nach einem Tag eine geringgradige Hyperämie feststellbar. In beiden Nebenserien lag der Kulminationspunkt der Hyperämie am 2. Tag, und nach 5 Tagen war sie praktisch verschwunden. Die Hyperämie schien in beiden Nebenserien stärker zu sein als die jener Tiere, welche physiologische Kochsalzlösung erhalten hatten, und war am stärksten in der b)-Nebenserie. In drei Fällen der a)-Nebenserie konnte man ausserdem makroskopisch Konsistenz- und Farbveränderungen des injizierten kaudalen Lungenteiles feststellen.

Was die Verteilung des injizierten Stoffes auf die verschiedenen Lungenanteile betrifft, wurde bei den Tieren der a)-Nebenserie CMC fast ausschliesslich in kaudalen und mittleren Teilen, bei den Tieren der b)-Nebenserie auch in kranialen Teilen

angetroffen. Am meisten CMC fand sich im kaudalen Teil der injizierten und der anderen Lunge.

In der Trachea fand man CMC nach dem Töten nur bei den Tieren der b)-Nebenserie, in den grösseren Bronchien jedoch auch bei den Tieren der a)-Nebenserie.

Neben der oben beschriebenen Hyperämie trat nach zwei Tagen in beiden Nebenserien als reaktive Erscheinung eine starke Makrophagenreaktion auf, besonders in den Alveolen, und in geringerem Ausmass sah man hauptsächlich in den Bronchiolen auch Granulozyten und Lymphozyten. Beide Leukozytenarten waren nach ungefähr 10 Tagen verschwunden. Der Inhalt der Makrophagen und auch der einiger Septumzellen färbte sich schwach metachromatisch. Extrazelluläre CMC liess sich in den Alveolen der Tiere der a)-Nebenserie noch nach 70 Tagen, aber nicht nach 5 Monaten feststellen, und in der b)-Nebenserie fand man sie entsprechend nach 5 Monaten, aber nicht nach 8 Monaten. Schwach metachromatisch sich anfärbende Makrophagen traten noch nach 8 Monaten in den Alveolen reichlicher auf als bei Kontrolltieren.

In den Lymphknoten und Lymphbahnen liess metachromatisch sich anfärbender Stoff 5 Tage nach der Injektion nachweisen, und noch nach einem Jahr war er in ihnen spärlich vorhanden.

Abweichend von dem bisher Erwähntem traten in der a)-Nebenserie in zwei Fällen (nach 50 Tagen und nach einem Jahr) auf Peribronchitis und bei einem Tier aus derselben Serie (nach 70 Tagen) auf Bronchitis hinweisende Veränderungen auf. Ausserdem umgab den erweiterten, zum Teil epithellosen Bronchus eines nach 50 Tagen getöteten Tieres derselben Serie atelektatisches Lungengewebe, dessen kollagenes Bindegewebe merklich vermehrt war. In den Alveolen waren reichlich Granulozyten und sich metachromatisch anfärbende Makrophagen. Im Lungenparenchym lagen zahlreiche Granulombildungen vor, in denen zum Teil in Zerfall befindliche Leukozyten, Fibroblasten, basophile, mehrkernige Riesenzellen und auch Plasmazellen vorhanden waren. Das eine Tier, das in Zusammenhang mit der Peribronchitis erwähnt und das nach einem Jahr getötet wurde, zeigte erweiterte Bronchien und Bronchiolen, aber keine Epithelveränderungen. Neben den peribronchitischen Verände-

rungen war das Bindegewebe des peribronchialen Lungenparenchyms vermehrt und enthielt Mastzellen sowie Fremdkörperriesenzellen. In den Bronchiolen war reichlich CMC und Makrophagen.

II. Hauptserie: Die Viskosität der CMC-Lösung 10 mal grösser als die von Wasser.

a) — Nebenserie: Injizierte Menge 0,1 ccm/100 g Körpergewicht.

*Nach einem Tag* war in sämtlichen Fällen der kaudale Teil der injizierten Lunge bis ungefähr 1 cm hoch fester und rötlicher als das übrige Lungengewebe. Die Lungen einer Ratte waren ausserdem insgesamt rötlicher als normal.

Die mikroskopische Untersuchung zeigte nur in einem Fall kleine CMC-Tropfen in der Trachea und in Verbindung damit reichlich Granulozyten und weniger Makrophagen. In den Bronchien und Bronchiolen der kaudalen Lungenabschnitt aller Tiere war CMC vorhanden, stellenweise in solchen Mengen, dass die kleineren Bronchien und Bronchiolen völlig verstopft waren. In den Bronchien und Bronchiolen waren auch reichlich Granulozyten, weniger Makrophagen und spärlich Rundzellen. In ziemlich grossen und einheitlichen Gebieten, die zusammen bis zu ungefähr  $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{2}$  der Schnittfläche durch den betreffenden Lobus oder Lungenteil ausmachten (Abb.: 11.), waren die Alveolen sowohl mit CMC als auch mit den erwähnten Zellen ausgefüllt. Die Alveolarsepten waren verdickt, was durch die Hyperämie des Lungengewebes bedingt wurde. Der Inhalt der Makrophagen und Septalzellen färbte sich schwach metachromatisch an, aber in den Lymphknoten und Lymphbahnen war kein in gleicher Weise sich anfärbender Stoff vorhanden. Mit Ausnahme eines Tieres war auch in den Bronchien der kranialen und mittleren Lungenteile und in den Alveolen CMC, aber merklich weniger, und es fanden sich auch nicht im gleichen Ausmass Granulozyten und Makrophagen.

*Nach zwei Tagen* waren die Lungen aller Tiere erheblich rötlicher als normal, und der kaudale Lungenteil einer Ratte normal, und der kaudale Lungenteil einer Ratte war wieder fester und rötlicher als die übrige Lunge.

Bei keinem Tier fand sich in der Trachea fremder Inhalt.

Die Blutfülle der Lungen war im Vergleich zu den am Tage zuvor getöteten Tiere stark vermehrt. In den kaudalen und mittleren Teilen der Lungen war die Zahl der Granulozyten stark vermehrt und so war auch die der Makrophagen. Die metachromatische Färbung des Inhaltes der Makrophagen war stark, und gleicher Weise enthielten auch die zentralen Lymphknoten sich ebenso verfärbende Partikel.

*Nach fünf Tagen* waren die Lungen sämtlicher Tiere weiterhin rötlicher als gewöhnlich.

Bei der mikroskopischen Untersuchung zeigte sich im Lungenparenchym Hyperämie, welche vielleicht geringgradiger erschien als die der nach zwei Tagen getöteten Ratten. In den kleineren Bronchien, Bronchiolen und Alveolen der kaudalen Lungenteile war weiterhin CMC vorhanden sowie ziemlich reichlich Granulozyten und Makrophagen. Derartige Alveolen fanden sich vor allem in peribronchialen und subpleuralen Teilen, und sie machten zusammen ungefähr die Hälfte der Schnittfläche dieses Lungenteiles aus (Abb.: 12.). Entzündungszelleninfiltration ins Lungengewebe kam nicht vor. Die Bronchien der kranialen und der mittleren Teile waren frei, aber in deren Alveolen fanden sich spärlich CMC-Tröpfchen sowie Granulozyten und Makrophagen.

*Nach zehn Tagen* näherte sich die Farbe der Lungen wieder dem normalen Befund. Die linke Lunge einer Ratte war grösser und die rechte kleiner als gewöhnlich. Im anderen Fall dagegen war die linke Lunge kleiner als normal, aber der rechte Unter- und Medianlappen waren merklich grösser als normal. Nach der Röntgenaufnahme hatte der Katheter sich im erstgenannten Fall im unteren Teil der rechten Lunge befunden, im letzteren in der Mittellinie, möglicherweise im Bereich der Bifurkation der Trachea.

Bei der histologischen Untersuchung ergab sich, dass das Parenchym der rechten Lunge des erstgenannten Tieres stark atelektatisch war (Abb.: 13.). In den Bronchien waren spärlich Granulozyten. Die Bronchien des Unterlappens waren frei; Atelektase fand sich dort nur stellenweise. In dessen peribronchialen Alveolen sah man spärlich CMC-Tröpfchen, dagegen aber eine merkbare Makrophagenreaktion und spärlich Granulozyten. Die linke Lunge war in ihrer Gesamtheit emphysematisch (Abb.: 14.)

und in den Alveolen des unteren Teiles waren spärlich CMC-Tröpfchen und Makrophagen. Im anderen Fall war entsprechend die linke Lunge atelektatisch und die rechte emphysematisch. Im mittleren und unteren Teil dieser emphysematischen Lunge waren einige CMC und Makrophagen enthaltende Alveolen.

Die Schnittfläche durch den rechten Medianlappen der dritten Ratte bestand zu  $\frac{1}{4}$  — bis  $\frac{1}{2}$  aus derartigen, in erster Linie peribronchialen und subpleuralen Gebieten, deren Bronchiolen und Alveolen reichlich CMC und Makrophagen enthielten. In den mittleren und kranialen Teilen waren nur ein paar CMC-Tröpfchen, aber keine nennenswerte Makrophagenreaktion.

*Nach zwanzig Tagen* liess sich in den Bronchien und Bronchiolen der kaudalen Teile kein fremder Inhalt feststellen, aber in deren Alveolen waren ziemlich reichlich CMC sowie Makrophagen vorhanden. Granulozyten und Rundzellen waren nicht mehr zu sehen.

Bei den *nach dreissig Tagen* getöteten Tieren hatte der Katheter sich im mittleren und unteren Teil der linken Lunge befunden. Der vorherrschende Zug dieser Stellen bei zwei Ratten waren von Makrophagen ausgefüllte Alveolen (Abb.: 15.). Die Makrophagen waren zum grössten Teil vakuolisiert und ihr Inhalt körnig. Unter ihnen befanden sich reichlich kernlose. An vielen Stellen waren die Makrophagen in den Alveolen frei oder längs der Septen zu sehen. Nur in wenigen Alveolen, ungefähr in 10 bis 20 pro Schnitt, sah man CMC-Tröpfchen. Bei der dritten Ratte kamen erheblich mehr CMC enthaltende Alveolen vor. Bei sämtlichen Tieren wich der Befund des kaudalen Abschnittes der anderen Lunge und auch der Befund der mittleren und kranialen Teile nicht vom Normalen ab.

*Nach fünfzig Tagen* waren im kaudalen Teil der einen Lunge bei zwei Ratten einige Alveolengruppen, in deren Alveolen spärlich CMC aber reichlich, zum Teil im Zerfall befindliche Makrophagen waren. In einem kleinen Bronchus war nahezu das Lumen verstopfend CMC vorhanden. Bei einer von den Ratten sah man in Verbindung mit einer Alveolengruppe, wie sie oben beschrieben wurde, eine sich metachromatisch färbende Fremdkörperriesenzelle.

Bei dem dritten Tier hatte der Katheter sich im rechten Medianlappen befunden. Dort fielen die erweiterten Bronchiallumina

am meisten auf (Abb. 16.); das Epithel der Bronchien war jedoch intakt. In den Bronchien fand sich reichlich Inhalt; auf Grund der Färbung handelte es sich wahrscheinlich um Bronchialschleim, in welchem ein paar Granulozyten und auch Rundzellen zu sehen waren. Das peribronchiale Lungengewebe war atelektatisch, und dessen kollagene Bindegewebsfasern waren vermehrt. In den Alveolen sah man reichlich vakuolisierte Makrophagen, deren Inhalt sich metachromatisch färbte. Die Zellkerne der Septumzellen färbten sich nur schwach.

*Nach siebzig Tagen* enthielt bei einer Ratte noch ungefähr die Hälfte der Alveolen des injizierten Lungenteiles sowohl CMC als auch Makrophagen (Abb.: 17.), aber diese Alveolen bildeten keine grössere, zusammenhängende Gebiete. In einem grösseren Bronchus waren CMC-Tropfen zu sehen. In den zwei anderen Ratten waren in entsprechenden Teilen einige Alveolengruppen, in denen sich metachromatisch anfärbende Makrophagen, aber überhaupt kein extrazelluläres CMC vorhanden war.

*Nach fünf Monaten* fand sich im mittleren und unteren Teil der injizierten, linken Lunge einer Ratte ein ziemlich grosses, einheitliches subpleurales Gebiet, in dessen Alveolen und einigen Bronchiolen reichlich CMC und zum Teil im Zerfall befindliche Makrophagen vorkamen. (Abb.: 18.)

Bei den beiden anderen Ratten war die Injektion in den rechten Unterlappen erfolgt, und in fast sämtlichen Alveolen sah man hier vor allem septumständige, teilweise im Zerfall befindliche Makrophagen, deren Inhalt sich deutlich metachromatisch anfärbte. Nur im Medianlobus eines dieser beiden Tiere, waren in einigen Alveolen CMC-Tröpfchen.

*Nach acht Monaten* war der Befund bei einer Ratte ungefähr identisch mit dem bei der vorigen Gruppe zuerst beschriebenen. Im rechten Unterlappen waren um einen kleinen Bronchus herum eine Anzahl Alveolen, in denen hauptsächlich isoliert auftretende, zerfallende Makrophagen zu sehen waren. Ein diesem Lappen entsprechendes Bild boten die kaudalen Teile beider Lungen der anderen Ratte. Auch hier enthielten die Makrophagen auf grund der Färbung spärlich CMC.

Beim dritten Tier fanden sich Gebiete um einige reichlich Granulozyten enthaltende Bronchien der kaudalen Lungenteile herum, deren alveolärer Bau wegen der in den Alveolen vorhan-



denen Granulozyten, zerfallenden Makrophagen sowie mit den letztgenannten vermischt vorkommenden Rundzellen schwer zu erkennen war (Abb.: 19). Extrazelluläre CMC konnte man mit Sicherheit nicht feststellen, dagegen färbte sich der Inhalt der meisten Makrophagen metachromatisch. In gleicher Weise sich anfärbender Stoff war ausserdem sowohl in peripheren als auch in zentralen Lymphknoten vorhanden. Fremdkörperriesenzellen wurden nicht beobachtet, auch keine Vermehrung des Bindegewebes. Die Bakterienfärbung war negativ.

Bei zwei *nach einem Jahr* getöteten Tieren waren in den kaudalen Lungenteilen einige kleine peribronchiale Alveolengruppen, in deren Alveolen vor allem freie oder septumständige, fast ausschliesslich kernlose, im Zerfall befindliche Makrophagen vorkamen, die nach der Färbung zu urteilen keine CMC enthielten. Ausserdem waren bei der anderen Ratte in den kleineren Bronchien, Bronchiolen und Alveolen des rechten Mittellappens ausserordentlich reichlich Granulozyten, spärlich Makrophagen und CMC-Tröpfchen vorhanden (Abb.: 20.). Mit der Bakterienfärbung liessen sich auch in diesem Fall keine Bakterien nachweisen. Eine Zunahme des Bindegewebes konnte nicht festgestellt werden.

b) — Nebenserie: Injizierte Menge 0,2 ccm/100 g Körpergewicht.

*Nach einem Tag* wirkten die Lungen zweier Tiere rötlicher als normal, und bei einem von diesen war der kaudale Teil derjenigen Lunge, in die die Injektion erfolgt war, bis ungefähr 1 cm hoch fester und rötlicher als die Umgebung.

Im mikroskopischen Bild war der Blutgehalt der Lungen der zuerst genannten Tiere merklich stärker als normal, im Vergleich zu diesen war der Blutgehalt beim dritten jedoch geringer. In der Trachea des letztgenannten Tieres waren kleine CMC-Tropfen, und der einzige bemerkenswerte Lungenbefund waren einige mit CMC gefüllte Alveolen im unteren Teil der linken Lunge. An dieser Stelle konnte man auch Septumzellen beobachten, deren Inhalt sich schwach metachromatisch färbte. Auch in den grösseren Bronchien der linken Lunge jenes Tieres, welches bei der Inspektion wegen der Festigkeit des unteren

Lungenabschnittes erwähnt wurde, war reichlich CMC und zwar am meisten im unteren Teil, wo sogar durch CMC verstopfte kleinere Bronchien und Bronchiolen vorkamen. Ungefähr die Hälfte der Alveolen auf den Schnittflächen durch den mittleren und unteren Teil der Lunge enthielten ebenfalls CMC. Ausserdem waren in den meisten Bronchien sowie in einem Teil der Alveolen reichlich Granulozyten sowie in geringerem Ausmass einzeln auftretende, schwach metachromatisch sich anfärbende Makrophagen. Beim dritten Tier war in fast sämtlichen Bronchien des rechten Medianlappens CMC, und auch fast alle Alveolen eines grossen subpleuralen Gebietes enthielten CMC mit hier und dort eingestreuten Granulozyten. In diesem Bereich waren die Alveolarsepten an vielen Stellen eingerissen, sodass die Alveolen zusammengefloßen waren. Im mittleren und oberen Teil beider Lungen waren ebenfalls CMC-enhaltende Alveolen, aber merklich weniger und ohne nennenswerte Makrophagenreaktion.

Bei keinem der Tiere konnte mit den benutzten Färbungsmethoden in den Lymphknoten oder Lymphbahnen der Lunge mit Sicherheit CMC festgestellt werden.

*Nach zwei Tagen* wies die Farbe aller Lungen auf Hyperämie hin. Ausserdem war der untere Teil der injizierten Lunge bei zwei Tieren fester und rötlicher als die übrige Lunge.

Die histologische Untersuchung ergab analog mit der Inspektion eine merkliche Hyperämie im Lungengewebe aller Tiere, welche ungefähr der Hyperämie der am Tage zuvor getöteten entsprach. In der Trachea wurde bei keinem Tier fremder Inhalt beobachtet. Besonders in zahlreichen Bronchien und Bronchiolen des mittleren und unteren Teiles der injizierten Lunge war weiterhin reichlich, sogar sie verstopfend CMC sowie auch zahlreiche Granulozyten, aber spärlich Makrophagen. CMC-haltige Alveolen fanden sich auch in den kranialen Teilen, aber nur spärlich. Die mit CMC gefüllten Alveolen traten in den kaudalen Lungenanteilen als weitausgedehnte, einheitliche, peribronchiale Gebiete auf, welche in einigen Präparaten nahezu die Hälfte der Schnittfläche des betreffenden Lungenteiles ausmachten. Die Septumzellen waren geschwollen und vorspringend, und bei vielen färbte sich der Inhalt schwach metachromatisch. Auch in den zentralen und



peripheren Lymphknoten war in dieser Weise schwach sich anfärbender Stoff vorhanden.

*Nach fünf Tagen* erschien die Farbe der Lungen aller Tiere fast normal.

Bei der mikroskopischen Betrachtung konnte man aber geringe Hyperämie feststellen, im Vergleich zu der vorhergehenden Gruppe war diese jedoch geringgradiger. In sämtlichen Fällen lag nahezu in jeder Beziehung der gleiche Befund vor: In einigen Bronchien sowohl des mittleren als auch unteren Teiles fanden sich CMC-Tröpfchen sowie verhältnismässig reichlich Makrophagen, aber fast gar keine Granulozyten. Auch in den Alveolen hatte die Zahl der Makrophagen im Vergleich zu der vorhergehenden Gruppe merklich zugenommen, die der Granulozyten dagegen hatte abgenommen. Infiltration von Entzündungszellen wurde nirgends beobachtet.

*Nach zehn Tagen* erschien die Farbe der Lungen zweier Tiere etwas dunkler als normal, und der untere Teil der linken, injizierten Lunge war in beiden Fällen von fester Konsistenz und dunkelrot.

Bei der histologischen Betrachtung wirkte die Blutfülle beider Lungen etwas vermehrt, und im Mittel- und Unterteil der injizierten Lunge waren besonders reichlich CMC, Makrophagen sowie auch spärlich Granulozyten enthaltende Bronchiolen und Alveolen. In den Bronchien fanden sich neben Makrophagengruppen ziemlich grosse CMC-Tropfen. Bei einem der Tiere waren in diesem Lungenteil durch Zerreißen der Septen zusammengefloßene Alveolen zu sehen (Abb.: 21.).

Im oberen Teil der linken Lunge der dritten Ratte traten um einen subpleuralen Bronchus starke peribronchitische Veränderungen auf (Abb.: 22.), und ausserdem enthielten die Alveolen dieses Gebietes reichlich metachromatisch sich anfärbende Makrophagen. Ganz subpleural fand sich ein mit Eiterzellen angefüllter Hohlraum von der Grösse einiger Alveolen, der möglicherweise durch Zerreißen der Alveolarsepten entstanden war. Das kollagene Bindegewebe der umgebenden Alveolarsepten schien vermehrt zu sein. Die Pleura war an dieser Stelle merklich verdickt und reichlich vaskularisiert, ihr kollagenes Bindegewebe deutlich vermehrt, und ausser Makrophagen waren dort auch Plasmazellen. Ausserdem waren in der Pleura ziemlich grosse,

mit Endothel bekleidete Hohlräume, die auf Grund der Färbung CMC enthielten (Abb.: 23). In den anderen Teilen derselben Lunge waren keine nennenswerten Parenchymveränderungen, aber die Pleura war stellenweise verdickt, und sie zeigte die gleichen Veränderungen wie oben beschrieben. Auch im Parenchym der rechten Lunge wurde nichts Besonderes beobachtet, aber deren Pleura wies an vielen Stellen genau denselben Befund auf wie die Pleura der linken Lunge.

*Nach zwanzig Tagen* wirkte die Farbe der Lungen normal, und auch die mikroskopische Untersuchung zeigte keine Zunahme des Blutgehaltes im Lungengewebe. In den Bronchien war kein fremder Inhalt vorhanden, aber auch in den Alveolen der kranialen Lungenteile fanden sich neben Makrophagen einige kleine CMC-Tropfen. Vor allem in kaudalen Abschnitten kamen unter den Alveolen auch solche vor, die vollständig und ausschliesslich mit CMC gefüllt waren. Die Alveolen enthielten keine Granulozyten.

Bei den *nach dreissig Tagen* getöteten Ratten sah man bei einer hiervon in der Trachea reichlich Makrophagen, aber nur im Bronchus des rechten Medianlappens einen CMC-Tropfen und in kaudalen Lungenteilen ein paar längs der Alveolarsepten gelegene Makrophagen. In den beiden anderen Fällen fanden sich in den Alveolen der peribronchialen und subpleuralen Gebiete der kaudalen Teile reichlich teilweise im Zerfall befindliche Makrophagen, aber nur in einigen Alveolen ein CMC-Tropfen.

*Nach fünfzig Tagen* waren bei zwei Ratten in den kaudalen Teilen beider Lungen noch immer viele mit Makrophagen gefüllte Alveolargruppen sowie auch einige CMC-Tropfen (Abb.: 24). Beim dritten Tier lag der gleiche Befund vor, aber lediglich in jenem Teil, in den die Injektion erfolgt war.

*Nach siebzig Tagen* ergab die mikroskopische Untersuchung bei einer Ratte, was das Lungenparenchym betrifft, einen am ehesten als normal anzusehenden Befund; auch in den Lymphknoten konnte mit Sicherheit kein metachromatisch sich färbender Stoff festgestellt werden. Als einzige Abweichung wurde eine grosse Menge Granulozyten in der Trachea festgestellt. Bei der anderen Ratte, bei der sich der Katheter in der Mittellinie

befunden hatte, war im rechten Medianlappen ein kleines peripheres Gebiet dessen Alveolen völlig mit CMC gefüllt waren, in der sich hier und da Makrophagen fanden. An dieser Stelle konnte man auch Reste zerfallener Alveolarsepten sehen. Im dritten Fall war in den mittleren und kaudalen Teilen beider Lungen sogar die Hälfte der Alveolen von solcher Art, dass sie entweder ausschliesslich CMC oder Makrophagen oder beides enthielten. Derartige Alveolen waren besonders in peribronchialen und subpleuralen Teilen zu sehen, und hier waren auch einige wahrscheinlich durch Zerreißen der Alveolarsepten entstandene Hohlräume vorhanden.

*Nach fünf Monaten* entsprach der Lungenbefund zweier Ratten sonst dem von Kontrolltieren, nur dass sich in den peripheren und zentralen Lymphknoten beider Lungen spärlich metachromatisch sich färbender Stoff vorfand.

Der untere Teil der linken Lunge der dritten Ratte bildete einen festen, gelblichen »Tumor« von etwa Kleinfingergrösse. Bei der mikroskopischen Untersuchung der rechten Lunge sah man am meisten in kaudalen Teilen und vor allem in der Nähe terminaler Bronchiolen kleine Alveolargruppen, in denen grösstenteils zerfallene Makrophagen vorkamen. Im oberen Teil der linken Lunge war das zwischen einem terminalen Bronchiolus und der Pleura gelegene Gebiet fast luftleer. Die Alveolen enthielten hier reichlich zum grössten Teil zerfallene Makrophagen mit metachromatisch sich färbendem Inhalt sowie auch eine gewisse Menge Granulozyten. Nahezu die gesamte Schnittfläche des unteren Teiles der linken Lunge, wo der Katheter sich wahrscheinlich befunden hatte, erfüllten zwei Hohlräume, die teilweise von mehrreihigem Bronchialepithel, teilweise vom abgeflachten Zylinderepithel und teilweise vom blossen Lungenparenchym umrandet wurden und die mit fast völlig autolysierten Granulozytenmassen ausgefüllt waren. Das die Hohlräume umgebende Lungengewebe war komprimiert (Abb.: 25.) und lediglich subpleural fand sich ein kleineres Gebiet, in dessen Bereich das Lungengewebe intakt erschien. Das kollagene Bindegewebe der Alveolarsepten war stark vermehrt und homogenisiert (Abb.: 26.). In den komprimierten Alveolen waren CMC-Tröpfchen, zerfallende Makrophagen sowie einige Granulozyten vorhanden. An einigen Stellen liess sich in den Alveolarsepten

Granulozyteninfiltration beobachten. Bakterien wurden weder im Lungenparenchym noch intraalveolär gefunden.

*Nach acht Monaten* konnte in keinem Fall mit Sicherheit CMC in den Alveolen oder Bronchien festgestellt werden. Im rechten Mittel- und Unterlappen sowie im unteren Teil der linken Lunge einer Ratte waren einige kleine Alveolargruppen, die mit zum grössten Teil im Zerfall befindlichen, aber metachromatisch sich anfärbenenden Makrophagen ausgefüllt waren. In den kaudalen Lungenteilen der beiden anderen Tiere lag derselbe Befund vor.

*Nach einem Jahr* stimmte der Lungenbefund von zwei Tieren in jeder Beziehung mit dem von Kontrolltieren überein. Im dritten Fall fand sich im unteren Teil derjenigen Lunge, in der sich der Katheter befunden hatte, in einem terminalen Bronchiolus schwach metachromatisch sich färbender Stoff und darin mehrere kernlose Makrophagen. Die Pleura war an dieser Stelle stark verdickt, deren kollagenes Bindegewebe vermehrt, und darin fanden sich mehrere auf Grund der Färbung deutlich CMC-enhaltende, mit platten endothelialen Zellen bekleidete Hohlräume.

Als *Zusammenfassung* kann über die in der Hauptserie II aufgetretenen Lungenveränderungen übereinstimmend mit der Hauptserie I festgestellt werden, dass diese im grössten Teil der Fälle derart waren, dass man sie als eine regelmässige, zu der CMC-Resorption gehörende Reaktion ansehen muss.

In gleicher Weise wie in der Hauptserie I kamen bereits vom ersten Tag an durch Hyperämie verursachte Farbveränderungen in den Lungen vor, und bei der histologischen Betrachtung erschien die Kongestion in dieser Serie stärker als bei den Tieren der Hauptserie I. Diese Kongestion war nach 2 Tagen am deutlichsten und nach 5 Tagen hatte sie bereits nachgelassen. Bei zwei Tieren der b) — Nebenserie war noch nach 10 Tagen stärkere Kongestion vorhanden als bei den Tieren, die physiologische Kochsalzlösung erhalten hatten. Im ganzen in fünf Fällen der b) — Nebenserie kamen in dem unteren Teil der injizierten Lunge Konsistenzveränderungen vor. Bei einem dieser Tiere, das nach 5 Monaten getötet worden war, bildete dieser untere Teil einen ungefähr kleinfingergrossen, gelblichen »Tumor«.

Die Verteilung des injizierten Stoffes auf die verschiedenen

Lungenteile entsprach ungefähr der bei der Hauptserie I festgestellten. So fand dieser Stoff sich in der a) — Nebenserie vor allem in den kaudalen und mittleren und bei der b) — Nebenserie auch in den kranialen Lungenteilen. Die Zahl der CMC-haltigen Bronchien, Bronchiolen und Alveolen entsprach ebenfalls der bei der Hauptserie I beschriebenen.

Als reaktive Veränderung trat schon vom 1. Tag nach der Injektion an besonders in den Alveolen eine starke Makrophagenreaktion auf, und in geringerem Masse traten besonders in den Bronchien auch Granulozyten und Lymphozyten auf. Schon nach 5 Tagen trat in der Zahl der Granulo- und Lymphozyten eine deutliche Verminderung ein und nach 20 Tagen waren sie praktisch völlig verschwunden. Schon nach Verlauf eines Tages war sowohl in den Makrophagen als auch in einigen Septumzellen metachromatisch sich färbender Inhalt festzustellen. Sowohl in peripheren als auch in zentralen Lymphknoten waren nach zwei Tagen in gleicher Weise sich anfärbende Partikel vorhanden.

In beiden Nebenserien konnte nach 20–30 Tagen eine Abnahme der Zahl der CMC-enthaltenden Alveolen festgestellt werden. In der a) — Nebenserie war nach 30 und in der b) — Nebenserie nach 50 Tagen keine extrazelluläre CMC mehr in den kranialen oder mittleren Lungenteilen zu sehen. Dagegen fand sich in den injizierten Lungenteilen zweier der a) — Nebenserie zugehörigen Tiere, die nach 8 Monaten und nach einem Jahr getötet wurden, noch immer freie CMC in den Alveolen. In der b) — Nebenserie konnte in einem Fall nach 5 Monaten der gleiche Befund erhoben werden. In beiden Nebenserien waren noch nach einem Jahr im Zerfall befindliche Makrophagen vorhanden, deren Inhalt sich schwach metachromatisch anfärbte.

Von dem oben Beschriebenen abweichend waren bei fünf Tieren der a) — Nebenserie und bei acht der b) — Nebenserie verschiedenartige Veränderungen zu erkennen, die man für durch CMC im Lungengewebe hervorgerufene Komplikationen ansehen muss. So kamen in fünf Fällen der b) — Nebenserie in den CMC-enthaltenden Lungenteilen kleine, offenbar durch Einreissen der Alveolarsepten entstandene Hohlräume vor

(1 Fall nach 1 Tag, 2 Fälle nach 10 Tagen und 2 Fälle nach 70 Tagen).

Atelektase einer Lunge oder eines Lungenlappens und gleichzeitig auftretendes Emphysem der anderen Lunge oder eines anderen Lungenlappens war schon makroskopisch bei zwei Tieren der a) — Nebenserie nach 10 Tagen zu sehen, ohne dass in diesen Fällen sichere entzündliche Veränderungen feststellbar waren.

Aussergewöhnlich weite Bronchien fanden sich bei je einem Tier der a) — und b) — Nebenserie (nach 50 Tagen und nach 5 Monaten). Beim ersteren waren auch erweiterte Bronchiolen vorhanden. Im letzteren Fall bekleidete den Bronchus teilweise intaktes Bronchialepithel, teilweise einreihig sich fortsetzendes Zylinderepithel und teilweise blosses atelektatisches Lungenparenchym. Ausserdem lagen starke peribronchitische Veränderungen vor. Bei beiden Tieren war das peribronchiale Lungengewebe atelektatisch und dessen Bindegewebe wies Zunahme der Zahl der kollagenen Fasern auf. Die Alveolen enthielten auch Makrophagen und im letzteren Fall ausserdem CMC.

Peribronchitische Veränderungen wurden in den Lungen zweier Tiere der a) — Nebenserie gefunden (nach 8 Monaten und nach einem Jahr), sowie eines Tieres der b) — Nebenserie (nach 10 Tagen) und ausserdem ein auf Tracheitis hinweisender Befund bei einem Tier der gleichen Nebenserie (nach 70 Tagen).

Reaktive Veränderungen der Pleura fanden sich in zwei Fällen in der b) — Nebenserie (nach 10 Tagen und nach einem Jahr). Der zuerst genannte Fall wurde bereits in Zusammenhang mit den peribronchitischen Veränderungen genannt. Die Pleura war an dieser Stelle stark verdickt und vaskularisiert, ihr kollagenes Bindegewebe vermehrt und neben Makrophagen enthielt sie Plasmazellen. Ferner waren dort ziemlich grosse mit Endothel bekleidete, CMC-haltige Hohlräume. Auch im anderen Lungenflügel waren gleichartige Veränderungen. Im letzteren Fall lag ein völlig gleicher Pleurabefund vor.

III. Hauptserie: Viskosität der CMC-Lösung 30 mal grösser als die von Wasser.

a) — Nebenserie: Injizierte Menge 0.1 ccm/100 g Körpergewicht.



*Nach einem Tag* waren die Lungen aller Tiere rötlicher als gewöhnlich, und bei einem war ausserdem der untere Teil der injizierten Lunge ungefähr  $\frac{1}{2}$  cm hoch fest und dunkelrot.

Im mikroskopischen Bild sah man ausnahmslos starke Blutfülle des Lungengewebes. In der Trachea aller Tiere waren neben CMC-Tropfen einige Granulozyten, aber nur spärlich Makrophagen. Der gleiche Inhalt wurde auch in grösseren Bronchien angetroffen, aber in den kaudalen Teilen enthielten diese mehr CMC. Völlig verstopfte Atemgänge fanden sich vor allem unter den terminalen Bronchiolen des Lungenteiles oder -lappens, in welchen die Injektion erfolgt war. In den Alveolen und Bronchiolen der injizierten und kaudalen Teile waren meist als einheitliche peribronchiale und subpleurale Gebiete entweder CMC-Tröpfchen oder deren Lumen völlig ausfüllend CMC und darin einige Granulozyten sowie ein paar Makrophagen mit schwach metachromatisch sich färbenden Inhalt. Die Septumzellen waren an dieser Stelle geschwollen, und auch deren Inhalt war schwach metachromatisch. Sowohl in peripheren als auch zentralen Lymphknoten sah man schwach metachromatisch sich anfärbenden Stoff.

*Nach zwei Tagen* waren die Lungen zweier Ratten dunkler als gewöhnlich. Die histologische Untersuchung ergab, dass der Blutgehalt der Lungen sämtlicher Ratten im Vergleich zu der am Tage vorher getöteten noch reichlicher war. In der Trachea zweier Tiere waren nur einige Granulozyten und im dritten Fall ausserdem einige kleine CMC-Tropfen. Auch in den grösseren Bronchien waren sowohl CMC-Menge als auch Granulozyten weniger geworden, dagegen hatte die Zahl der Makrophagen zugenommen. Unter den Granulozyten fanden sich auch einige Rundzellen. In mehreren kleineren Bronchien und besonders in Bronchiolen waren weiterhin diese verstopfende Granulozytenmassen. Die Zahl der CMC-enhaltenden Alveolen war ungefähr gleich gross wie am Tage zuvor. Auch in den Bronchiolen und Alveolen waren weniger Granulozyten, aber mehr Makrophagen. Der Inhalt der letztgenannten färbte sich stärker metachromatisch als bei der vorhergehenden Gruppe, und in gleicher Weise verhielt sich die extrazelluläre CMC.

*Nach fünf Tagen* wirkte der makroskopische Befund insgesamt schon wie bei intakten Kontrolltieren. In der Trachea und in



den grösseren Bronchien kamen nur kleine Granulozyten- und Makrophagengruppen vor. Der Blutgehalt der Lungen erschien stärker als der von Kontrolltieren, jedoch geringer als bei den am Tage zuvor getöteten Tieren. In zwei Fällen fanden sich in den kaudalen Lungenteilen mehrere mit CMC verstopfte kleinere Bronchien und Bronchiolen sowie als einheitliche Gebiete damit ausgefüllte Alveolen. Sowohl Granulozyten als auch Rundzellen waren praktisch verschwunden, wohingegen die Zahl der Makrophagen weiter zugenommen hatte. In den kranialen Teilen war spärlich CMC, aber ziemlich reichlich Makrophagen.

*Nach zehn Tagen* waren in zwei Fällen der untere Teil der injizierten Lunge bis zur Höhe von  $\frac{1}{2}$  cm und im dritten Fall die Hälfte des rechten Oberlappens fester als die Umgebung und glasig grau. Die mikroskopische Untersuchung des betreffenden Lungenlappens zeigte, dass ungefähr die Hälfte davon nahezu luftleeres Gebiet war, in welchem ziemlich starke für Peribronchitis charakteristische Veränderungen vorhanden waren. Ausserdem waren in den Bronchiolen und Alveolen CMC und Makrophagen vorhanden. Auch in den anderen Lappen derselben Lunge fanden sich reichlich CMC und Makrophagen, aber keine Granulozyten. Das gleiche war auch in den kaudalen Teilen der injizierten Lunge der beiden anderen Tiere der Fall. Unter den Makrophagen befanden sich zahlreiche kernlose und vakuolisierte. Der Blutgehalt der Lungen aller Tiere wirkte noch geringgradig vermehrt im Vergleich zu dem intakter Kontrolltiere.

*Nach zwanzig Tagen* war der makroskopische Befund unauffällig. In allen drei Fällen waren in dem kaudalen Teil der injizierten Lunge zahlreiche mit CMC oder Makrophagen oder mit beidem gefüllte Bronchiolen und Alveolen. In einem Fall nahmen diese ungefähr die Hälfte der Schnittfläche durch den betreffenden Lungenteil ein (Abb.: 27.), und an dieser Stelle kamen auch einige durch Zerreißen der Alveolarsepten entstandene kleine Hohlräume vor. In den mittleren und kranialen Teilen waren in den Bronchiolen und Alveolen ziemlich reichlich Makrophagen. Hyperämie des Lungengewebes wurde nicht beobachtet.

*Nach dreissig Tagen* fanden sich in einem Fall in den kaudalen

Abschnitten beider Lungen begrenzte Gebiete, in deren Bereich peribronchitische Veränderungen und ausserdem in den Alveolen reichlich teilweise im Zerfall befindliche Makrophagen, aber nur spärlich kleine CMC-Tropfen zu sehen waren. Beim anderen Tier waren in den Alveolen des rechten Oberlappens reichlich CMC und zerfallende Makrophagen vorhanden, wie auch in dem injizierten Lungenteil des dritten Tieres, jedoch war hier nur wenig extrazelluläre CMC.

*Nach fünfzig Tagen* war der untere Teil der injizierten Lunge einer Ratte fester als die übrige Lunge. Bei der mikroskopischen Untersuchungen erblickte man hier und auch im kaudalen Abschnitt der injizierten Lunge eines anderen Tieres fast ausschliesslich von Alveolen, die mit im Zerfall befindlichen Makrophagen erfüllt waren, gebildete Gebiete, in denen spärlich extrazelluläre CMC vorhanden war. Zunahme des Bindegewebes konnte nicht nachgewiesen werden. Im dritten Fall waren beiderseits in den kaudalen Teilen nur hier und da Alveolen, in denen spärlich Makrophagen vorkamen.

*Nach siebenzig Tagen* ergab sich bei einem Tier der gleiche Befund wie bei den beiden zuerst beschriebenen Tieren der vorigen Gruppe. In den entsprechenden Lungenteilen der anderen Ratte waren in den Alveolen ausschliesslich Makrophagen, und das gleiche war in den kaudalen Teilen beider Lungen der dritten Ratte der Fall.

*Nach fünf Monaten* waren in den kaudalen Abschnitten der injizierten Lungen zweier Ratten ziemlich reichlich, meistens an den Septen entlang gelegene, grösstenteils zerfallene, aber noch immer deutlich metachromatisch sich färbende Makrophagen vorhanden. Beim dritten Tier waren in dem Lungenlappen, in den die Injektion wahrscheinlich erfolgt war, peribronchitische Veränderungen, die ein zwischen einem kleineren Bronchus und der Pleura gelegenes Gebiet umfassten. In dem Bronchus und in den Bronchiolen und Alveolen des betreffenden Gebietes fanden sich sehr reichlich CMC sowie Makrophagen (Abb.: 28). An einigen Stellen waren durch Zerreißen der Septen ein paar kleinere Hohlräume entstanden. An der Pleura konnten keine reaktiven Veränderungen festgestellt werden. Auch gelang es nicht irgendwelche Bakterien mit der Bakterienfärbung sichtbar zu machen.

*Nach acht Monaten* waren in den kaudalen Teilen der injizierten Lungen zweier Ratten einige kleinere Gebiete, in deren Bereich deutliche peribronchitische Veränderungen vorkamen. In den Alveolen waren auch Makrophagen sowie spärlich CMC. In der einen Lunge der anderen Ratte fanden sich derartige Veränderungen im Bereich zweier Bronchien. Beider Lumen wirkte vergrössert, und das Epithel des einen war teilweise abgeflacht und wurde von einreihigem Zylinderepithel gebildet; zum Teil fehlte jegliches Epithel und in dieser Richtung enthielten die umgebenden Alveolen besonders reichlich Eiterzellen. In den kaudalen Teilen beider Lungen der dritten Ratte waren mässig Makrophagen und ein paar CMC-Tröpfchen.

*Nach einem Jahr* fand sich im kaudalen Abschnitt der injizierten Lunge einer Ratte ein kleines Gebiet, in dessen Alveolen hier und da ein im Zerfall befindlicher Makrophag und ein CMC-Tropfen vorkam (Abb.: 29.). In dem entsprechenden Teil der anderen Ratte trat in Verbindung mit einem kleinen Bronchus ein auf Peribronchitis hinweisender Befund auf, und in den umgebenden Alveolen sah man auch zum grössten Teil zerfallene Makrophagen und spärlich CMC. Bakterien liessen sich färbereich nicht nachweisen.

Der rechte Oberlappen der dritten Ratte fiel bereits makroskopisch auf, indem dessen andere Hälfte luftleer und grau erschien. Die mikroskopische Untersuchung zeigte auch in dessen grösstem Bronchus besonders reichlich autolytierte Eiterzellen. Das Epithel wies stellenweise Zeichen von Nekrotisierung auf. Das peribronchiale Lungengewebe war stark atelektatisch, stellenweise war der alveoläre Aufbau fast verschwunden. Besonders in den subpleuralen Alveolen, zwischen denen offenbar durch Einreissen der Alveolarsepten entstandene Hohlräume vorkamen, waren in den Alveolen neben Eiterzellen reichlich CMC und Makrophagen vorhanden. Das kollagene Bindegewebe der Septen war vermehrt, das Bindegewebe war dabei, zu homogenisieren, und stellenweise sah man Granulozytenansammlungen und mitten darin eine kleine Makrophagengruppe.

b) — Nebenserie: Injizierte Menge 0.2 ccm/100 g Körpergewicht.

*Nach einem Tag* wies die Farbe der Lungen sämtlicher Tiere auf eine starke Hyperämie hin. Ausserdem waren der rechte Median- und Mittellappen einer Ratte kleiner als normal, was offenbar durch verminderten Luftgehalt bedingt wurde.

Die histologische Untersuchung zeigte ausnahmslos merkbare Kongestion im Lungenparenchym. In der Trachea kamen kleine CMC-Tropfen und spärlich Makrophagen vor. Der gleiche Befund ergab sich auch für die grösseren Bronchien. Unter den kleineren Bronchien und terminalen Bronchiolen auch der kranialen Lungenteile fanden sich reichlich durch CMC verstopfte. In den gleichen Teilen war hier und da ein Alveolus, welcher CMC, einige wenige, schwach metachromatisch sich färbende Makrophagen sowie Granulozyten enthielt. In den kaudalen Teilen fand sich ebenfalls der gleiche Inhalt, aber in erheblich stärkerer Masse (Abb.: 30.). Stellenweise färbte sich der Inhalt der Septumzellen schwach metachromatisch, und ebensolcher Stoff kam sowohl in peripheren als auch zentralen Lymphknoten vor.

Analog mit dem makroskopischen Befund war in dem rechten Mittel- und Medianlappen einer Ratte starke Atelektase vorhanden. In den Bronchien und Alveolen war kein fremder Inhalt zu sehen; lediglich ein Bronchiolus war völlig mit CMC verstopft. Ebenso starke Atelektase fand sich auch bei der anderen Ratte, und zwar im rechten Mittellappen, und auch hier war nur in einem Bronchus ein kleiner CMC-Tropfen. In beiden Fällen hatte sich der Katheter im Augenblick der Injektion auf der Seite der rechten Lunge befunden.

*Nach zwei Tagen* erwiesen sich die Lungen eines jeden Tieres noch immer recht bluthaltig, und ausserdem waren der rechte Medianlappen eines Tieres und die ganze linke Lunge eines anderen kleiner und fester als normal.

Im mikroskopischen Bild wirkte die Kongestion der Lungen aller Ratten noch reichlicher als bei den am Tage zuvor getöteten. Der übrige Befund wich insofern ab, dass die CMC aus der Trachea und den grösseren Bronchien praktisch völlig verschwunden war, aber dafür fanden sich dort deutlich mehr und

metachromatisch sich stärker anfärbende Makrophagen sowie Granulozyten und auch Rundzellen. Die CMC-Menge in den Atemgängen und Alveolen war ungefähr wie am Tage zuvor. Auch in den Alveolen kamen ziemlich reichlich Makrophagen sowie Granulozyten und Rundzellen vor.

Im Parenchym des rechten Medianlappens der bei der Inspektion erwähnten Ratte, sowie im Parenchym der linken Lunge des anderen Tieres fand sich merkliche Atelektase und in deren Bereich in fast jedem Bronchus und auch in einigen Alveolen reichlich CMC. In beiden Fällen hatte der Katheter sich in der Mittellinie befunden.

*Nach fünf Tagen* bestanden weiterhin ausnahmslos Zeichen der Hyperämie, und ausserdem wirkte der untere Teil der injizierten Lunge einer Ratte ziemlich fest. Beim histologischen Befund muss erwähnt werden, dass die Kongestion im Vergleich zu der vorigen Gruppe abgenommen zu haben schien. In der Trachea und in den grösseren Bronchien waren kleine Makrophagen- und Granulozytengruppen. Dagegen fanden sich besonders in kaudalen Teilen zahlreiche kleinere mit CMC völlig ausgefüllte Bronchien, Bronchiolen und Alveolen. Darin waren einige Granulo- und Lymphozyten zu sehen, aber vielleicht noch mehr Makrophagen als zuvor.

*Nach zehn Tagen* war in allen drei Fällen der untere Teil der injizierten Lunge fester als das übrige Lungengewebe, und in einem Fall kamen auch Zeichen einer allgemeinen Hyperämie vor.

Bei der histologischen Untersuchung wiesen alle Tiere eine geringere Kongestion auf als die Tiere der zuletzt beschriebenen Gruppe. In den nichtinjizierten Lungenteilen sah man nur in einigen Alveolen kleine CMC-Tropfen, aber sogar reichlich Makrophagen. Besonders im unteren Teil der injizierten Lunge fanden sich besonders peribronchial und subpleural ziemlich ausgedehnte, nahezu luftleere Bezirke, in deren Alveolen entweder CMC, Makrophagen oder beides sehr reichlich und äusserst spärlich Granulo- und Lymphozyten vorkamen. In einem derartigen injizierten Lungenteil einer Ratte konnte man ausserdem auf vielen Stellen starke peribronchitische Veränderungen feststellen.

*Nach zwanzig Tagen* kamen bei einer Ratte ein kleiner Mittel-

und Medianlappen der rechten Lunge vor, deren Luftgehalt vermindert erschien.

Es zeigte sich, dass in den genannten Lappen starke Atelektase vorhanden war und dass in den Alveolen hier und da kleine CMC-Tropfen vorkamen, wohingegen die Bronchien völlig frei waren. Der Blutgehalt des Lungenparenchyms wirkte bei sämtlichen Tieren ungefähr normal. Im Vergleich zu der vorhergehenden Gruppe waren die Hauptunterschiede, dass in den Atemgängen und Alveolen der kaudalen Lungenteile dieser Tiere überhaupt keine Granulo- und Lymphozyten auftraten. Ausserdem schien es, als ob weniger mit CMC verstopfte Bronchien und Bronchiolen vorhanden wären.

*Nach dreissig Tagen* waren der rechte Mittel- und Medianlappen eines Tieres ziemlich klein und offenbar atelektatisch. Die Konsistenz des unteren Teiles der injizierten Lunge eines anderen Tieres wirkte fest.

Die mikroskopische Untersuchung ergab, dass die erwähnten Lungenlappen atelektatisch waren und dass in deren Alveolen spärlich kleine CMC-Tropfen, aber reichlich teilweise im Zerfall befindliche Makrophagen vorkamen. In den Bronchien war kein fremder Inhalt zu sehen. Kongestion konnte weder bei diesem Tier noch bei den anderen derselben Gruppe festgestellt werden. Der Befund der kaudalen Lungenteile stimmte mit dem der vorigen Gruppe überein, ein Unterschied bestand höchstens darin, dass unter den Makrophagen auch solche vorkamen, die sich im Zerfall befanden. In einem Fall kamen an dieser Stelle einige zerrissene Alveolarsepten vor. Ebenfalls fanden sich auch einige mit CMC gefüllte kleinere Bronchien und Bronchiolen. Auch in den kranialen Teilen sah man weiterhin spärlich CMC-Tröpfchen, jedoch reichlich Makrophagen.

*Nach fünfzig Tagen* war der kaudale Teil der injizierten Lunge einer Ratte ziemlich fest und glasig grau. Die gesamte rechte Lunge einer anderen Ratte erschien klein und von fester Konsistenz, die linke dagegen grösser als normal.

In dem zuerst erwähnten Fall fanden sich in den kaudalen Teilen der injizierten Lunge in kleineren Bronchien, Bronchiolen und Alveolen CMC und im Zerfall befindliche Makrophagen, sogar in solchen Mengen, dass ungefähr jeder zweite Alveolus mit beidem ausgefüllt war (Abb.: 31.). Die Bronchien der rech-



ten Lunge der anderen bereits erwähnten Ratte waren erweitert, aber das Epithel schien intakt zu sein. Einige grössere Bronchien enthielten ein paar CMC-Tropfen. Das Lungengewebe war stark atelektatisch und stellenweise kamen in den Alveolen zerfallene Makrophagen vor, aber keine deutlich extrazelluläre CMC. Im Unter- und Medianlappen war das Parenchym bis zu einem solchen Grad atelektatisch, das der alveoläre Aufbau praktisch verschwunden war, und ausserdem sah man darin stellenweise erhebliche peribronchitische Veränderungen. In den Alveolen fanden sich in grossen Mengen metachromatisch sich färbende Makrophagen, sogar als Konglomerate und dazwischen auch Mastzellen. Zunahme des Bindegewebes wurde nicht beobachtet. In der ganzen linken Lunge lag ein starkes Emphysem vor, und in deren Alveolen war hier und da, vor allem septumständig, eine Makrophagengruppe vorhanden. In diesem Fall hatte sich der Katheter in der Mittellinie befunden.

*Nach siebenzig Tagen* bildeten einen vom Normalen abweichenden Befund das laterale Drittel des rechten Oberlappens einer Ratte, welches von fester Konsistenz und glasig grau war, sowie der luftleer erscheinende rechte Medianlappen beim selben Tier.

Bei der histologischen Untersuchung liess sich feststellen, dass fast jeder Alveolus dieses Oberlappendrittels mit CMC ausgefüllt war und dass viele Alveolen ausserdem Makrophagen enthielten. Hier und da sah man zerrissene Alveolarsepten. Auch in den grössten Bronchien kamen einige CMC-Tropfen vor. Der rechte Medianlappen war stark atelektatisch, und in dessen Alveolen fanden sich reichlich grösstenteils zerfallene Makrophagen mit metachromatischem Inhalt. Die linke Lunge wies nichts Erwähnenswertes auf. Auch in diesem Fall hatte der Katheter sich in der Mittellinie befunden. Die beiden anderen Tiere zeigten ungefähr das gleiche Bild: In den Alveolen der kranialen Teile fanden sich spärlich hier und da vor allem septumständige und zerfallene Makrophagen. Die subpleuralen Alveolen der kaudalen Teile enthielten einige kleine CMC-Tropfen und reichlich Makrophagen; in einigen terminalen Bronchiolen war merklich CMC vorhanden.

*Nach fünf Monaten* waren keine makroskopischen Veränderungen feststellbar. Bei zwei Tieren fanden sich in peribronchia-



len und subpleuralen Gebieten der mittleren und kaudalen Teile der injizierten Lunge noch immer zahlreiche von im Zerfall befindlichen Makrophagen teilweise oder ganz ausgefüllte Alveolen; nur bei einem sah man an dieser Stelle in einigen Alveolen kleine CMC-Tropfen. In der nicht injizierten Lunge kamen noch spärlicher Makrophagen vor und ungefähr gleich viele fanden sich bei der dritten Ratte in den mittleren und kaudalen Teilen beider Lungen.

*Nach acht Monaten* konnte man in einem Fall ein paar kleine Alveolengruppen in den kaudalen Teilen beider Lungen feststellen, welche septumständige, zerfallende Makrophagen enthielten. In den beiden anderen Fällen waren in dem kaudalsten Abschnitt der injizierten Lunge dieselben Zellen besonders reichlich vorhanden, und ausserdem waren ungefähr zwanzig Alveolen nahezu mit CMC ausgefüllt (Abb.: 32). Zerrissene Alveolarsepten waren nicht zu sehen, auch keine Bindegewebsveränderungen.

*Nach einem Jahr* zeigten der rechte Mittellappen und der kaudale Abschnitt der linken Lunge eine ziemlich feste Konsistenz und sahen grau aus.

Bei der genaueren Untersuchung des Mittellappens ergab sich, dass ungefähr  $\frac{2}{3}$  seiner Durchschnittsfläche von nahezu luftleeren Alveolen gebildet wurde, in denen eine grosse Anzahl schwach metachromatisch sich anfärbender Makrophagen und spärlich Granulozyten und Lymphozyten vorkamen. In den Septen waren keine nennenswerten Veränderungen vorhanden, aber das Parenchym enthielt reichlich Mastzellen. Auch im rechten Oberlappen war ein gleichartiges, kleineres, zwischen einem peripheren Bronchus und der Pleura gelegenes Gebiet und ebenfalls an verschiedenen Stellen des mittleren und kaudalen Teiles der linken Lunge, aber mit dem Unterschied, dass in deren Alveolen auch reichlich CMC vorhanden war. Auch in diesem Fall kamen keine Bindegewebsveränderungen oder reaktive Veränderungen der Pleura vor. Im Bereich des kaudalen Abschnitts der linken Lunge der anderen Ratte lag ein entsprechender Befund vor, aber hier war ausserdem das kollagene Bindegewebe der Septen vermehrt und homogenisiert und ferner traten reichlich Mastzellen auf. In dem mittleren und kaudalen Teil der injizierten Lunge der dritten Ratte fanden

sich kleine Alveolengruppen, in denen spärlich septumständige, zerfallene Makrophagen vorkamen und in einigen auch ein kleiner CMC-Tropfen.

Zusammenfassend kann über die bei den Tieren der Hauptserie III beobachteten Lungenveränderungen analog wie über die in den beiden vorhergehenden Hauptserien ange-  
troffenen Veränderungen gesagt werden, dass man sie in den meisten Fällen der zur CMC-Resorption gehörigen regelmässigen Reaktion hinzuzählen muss.

Sowohl makroskopische als auch mikroskopische Hyperämie war bei den Tieren dieser Hauptserie schon vom ersten Tag nach der Injektion an feststellbar. Die Kulmination der Blutfülle fand sich nach zwei Tagen; nach fünf Tagen schien sie bereits geringgradiger. Im Vergleich zu den anderen Hauptserien war die Kongestion in dieser Hauptserie am stärksten. Noch nach 10 Tagen war in der III a) — Nebenserie Hyperämie vorhanden; in der III b) — Nebenserie war sie nach 20 Tagen verschwunden. Veränderungen der Konsistenz des kaudalen Abschnitts der injizierten Lunge fanden sich bei sechs Tieren der a) — Nebenserie und bei fünf Tieren der b) — Nebenserie. Eins von den letztgenannten war ein nach einem Jahr getötetes Tier. In je einem Fall der a) — Nebenserie und b) — Nebenserie kam ausnahmsweise eine derartige Veränderung woanders vor, im ersteren im Mittellappen der rechten Lunge, im letzteren im Oberlappen. Ausserdem waren in der b) — Nebenserie 4 solche Tiere vorhanden, in deren Lungen eine deutliche entweder die gesamte eine Lunge oder einen Lungenlappen umfassende Atelektase vorkam, was durch die histologische Untersuchung gesichert wurde. In allen vier Fällen hatte der Katheter sich in der Mittellinie befunden.

In der Verteilung des injizierten Stoffes auf die verschiedenen Lungenteile war grundsätzlich gleiche Regelmässigkeit vorhanden wie auch in den anderen Hauptserien. Den bemerkenswertesten Unterschied bildete jedoch, dass bei den Tieren dieser Hauptserie weniger CMC-haltige Alveolen vorkamen als in den beiden anderen Hauptserien.

Die Zellreaktion in den Atemgängen und Alveolen war vom 1. Tag nach der Injektion an die gleiche wie bei der Hauptserie II: Besonders in den Alveolen trat eine starke Makrophagenreaktion

auf, und in geringeren Masse fanden sich dort Granulozyten und auch Lymphozyten. Die beiden letztgenannten Zellarten waren ebenfalls nach 20 Tagen verschwunden. Auch die Färbbarkeit der in den Makrophagen, Septumzellen sowie Lymphknoten vorhandenen Partikel entsprach der bei der Hauptserie II beschriebenen.

Nach zwanzig Tagen begann die in den Lungen enthaltene CMC-Menge deutlich geringer zu werden. Nach dreissig Tagen war in den Bronchien kein CMC mehr vorhanden. Nach siebzig Tagen liess sich extrazelluläre CMC nur in einem Fall der a) — Nebenserie feststellen, aber in den Lungenalveolen der Tiere der b) — Nebenserie war sie ziemlich reichlich vorhanden, sogar in vielen terminalen Bronchiolen. Nach 5 Monaten waren in je einem Fall beider Nebenserien in den injizierten Lungenteilen einige kleine Alveolengruppen, in deren Alveolen wenige CMC-Tröpfchen vorkamen. Ausserdem fanden sich bei sämtlichen Tieren, stellenweise sogar reichlich, wenn auch immer mehr zerfallene Makrophagen. Noch nach einem Jahr enthielten die Alveolen der injizierten Teile beider Nebenserien im Vergleich zu den Kontrolltieren etwas mehr zerfallende Makrophagen sowie auch einige CMC-Tröpfchen, die bei den Tieren der b) — Nebenserie etwas reichlicher vorhanden waren als bei den der a) — Nebenserie.

Ein von dem oben beschriebenen abweichender Befund kam bei acht Tieren der a) — Nebenserie und bei neun Tieren der b) — Nebenserie vor und könnte somit als eine durch CMC verursachte Komplikation angesehen werden.

Wahrscheinlich durch Einreissen von Alveolarsepten entstandene kleine Hohlräume fanden sich in den CMC enthaltenden Lungenteilen in drei Fällen der a) — Nebenserie (nach 20 Tagen, nach 5 Monaten und nach einem Jahr) und in zwei Fällen der b) — Nebenserie (nach 30 und nach 70 Tagen).

Abweichend weite Bronchien wurden bei je einem Tiere der a) — und b) — Nebenserie gesehen (nach 8 Monaten und nach 50 Tagen). Im ersteren Fall war das Epithel des betreffenden Bronchus teilweise abgeflacht und wurde von einreihigem Zylinderepithel gebildet; teilweise fehlte jegliches Epithel. Ausserdem waren an dieser Stelle starke peribronchitische Veränderungen vorhanden, und in den umgebenden Alveolen kamen auch

Makrophagen sowie spärlich CMC vor. Im letzteren Fall konnten keine Epithelveränderungen, jedoch starke auf Peribronchitis hinweisende Veränderungen festgestellt werden. Unter den Makrophagen befanden sich auch Mastzellen.

Ein auf Peribronchitis hinweisender Befund ergab sich ausser in den beiden bereits erwähnten Fällen ausserdem bei drei Tieren der a) — und bei einem Tier der b) — Nebenserie (nach 10 und 30 Tagen, nach einem Jahr sowie nach 10 Tagen).

Reaktive Bindegewebsveränderungen kamen bei einem nach einem Jahr getöteten Tier der a) — Nebenserie vor. Es handelte sich um den rechten Oberlappen, in dem neben Peribronchitis auch ein durch Reißen der Alveolarsepten entstandener kleiner Hohlraum vorhanden war, welcher wie die Alveolen reichlich CMC enthielt. Die kollagene Bindegewebsfasern der Alveolarsepten hatten reichlich zugenommen und waren homogenisiert. Stellenweise fanden sich in den Septen kleine Granulozytenansammlungen, in deren Mitte kleine Makrophagengruppen vorkamen.

#### VERGLEICHENDE ZUSAMMENFASSUNG DER DURCH CMC IN DEN VERSCHIEDENEN SERIEN VERURSACHTEN LUNGENVERÄNDERUNGEN

In der folgenden Zusammenfassung werden die in den verschiedenen Serien aufgetretenen, bereits beschriebenen, durch CMC verursachten Lungenveränderungen miteinander verglichen. In den verschiedenen Serien wurde CMC-Lösung in folgender Weise angewandt:

I. Hauptserie: Viskosität der CMC-Lösung 5 mal grösser als die von Wasser.

a) — Nebenserie: Injizierte Menge 0.1 ccm/100 g Körpergewicht.

b) — Nebenserie: Injizierte Menge 0.2 ccm/100 g Körpergewicht.

II. Hauptserie: Viskosität der CMC-Lösung 10 mal grösser als die von Wasser.

a) — Nebenserie: Injizierte Menge 0.1 ccm/100 g Körpergewicht.

- b) — Nebenserie: Injizierte Menge 0.2 ccm/100 g Körpergewicht.

III. Hauptserie: Viskosität der CMC-Lösung 30 mal grösser als die von Wasser.

- a) — Nebenserie: Injizierte Menge 0.1 ccm/100 g Körpergewicht.

- b) — Nebenserie: Injizierte Menge 0.2 ccm/100 g Körpergewicht.

Jede Hauptserie umfasste 66 Ratten. Aus jeder Nebenserie wurden je 3 Tiere jeweils 1, 2, 5, 10, 20, 30, 50, 70 Tage und 5, 8 und 12 Monate nach erfolgter Injektion getötet, mit anderen Worten insgesamt 33 Tiere.

#### MAKROSKOPISCHE VERÄNDERUNGEN

Beim Öffnen des Thorax liessen sich in keinem Fall Zeichen dafür finden, dass der Katheter durch das Lungengewebe in die Pleurahöhle eingedrungen wäre.

Mit Ausnahme der Tiere der I a) — Nebenserie sowie zweier Tiere der II a) — Nebenserie traten bereits nach einem Tag in sämtlichen Fällen deutliche makroskopische Zeichen einer Lungenhyperämie auf und allgemein am stärksten bei den Tieren der Hauptserie III. Die Kulmination der Hyperämie war ungefähr am zweiten Tage, und nach 10 Tagen trat praktisch keine Hyperämie mehr auf. Ausserdem kamen bereits vom 1. Tag nach der Injektion an deutliche Konsistenzveränderungen der injizierten Lunge einiger Tiere vor, am häufigsten im kaudalsten Abschnitt in Form eines im Vergleich zu der Umgebung festeren Gebietes, welches bis zu 1 cm hoch reichte. In zwei Fällen der Hauptserie III fanden sich derartige Veränderungen abweichend im rechten Medianlappen und in einem Fall im rechten Oberlappen. Allgemein traten nach 5 Monaten keine Konsistenzveränderungen mehr auf, lediglich bei einem Tier der III b) — Nebenserie liessen sich solche noch nach einem Jahr feststellen.

Die Fälle mit Konsistenzveränderungen verteilten sich folgendermassen auf die verschiedenen Serien:

I a): 3 Fälle	II a): 0 Fälle	III a): 7 Fälle
I b): 0 »	II b): 5 »	III b): 5 »
Zus.: 3 Fälle	5 Fälle	12 Fälle

Ausserdem kam bei vier Tieren der III b) — Nebenserie auch auf Atelektase hinweisende Abnahme des Luftgehaltes vor, welche irgendeinen Lappen der rechten Lunge oder eine der beiden Lungen ganz umfasste. Dies liess sich bereits nach einem Tag beobachten, jedoch nicht mehr nach 70 Tagen. In sämtlichen Fällen hatte der Katheter sich im Augenblick der Injektion in der Mittellinie des Brustkorbes befunden.

#### MIKROSKOPISCHE VERÄNDERUNGEN

##### *Verteilung der injizierten CMC auf die verschiedenen Teile der Lunge*

In allen Serien war in dieser Hinsicht ungefähr gleiche Regelmässigkeit zu beobachten. Zwar konnten besonders in Abhängigkeit von der Lage der Katheterspitze auch zwischen den Tieren derselben Serie grosse Unterschiede auftreten. Die Art der Injektion in Betracht nehmend ist es natürlich, dass die injizierten kaudalen Lungenteile am meisten, die kranialen am wenigsten CMC enthielten. Besonders in den b) — Nebenserien kam auch in der anderen, der nicht injizierten Lunge CMC vor. In der Trachea und in den grösseren Bronchien waren während der ersten Tage nach der Injektion allgemein nur kleinere CMC-Tropfen vorhanden; nur einige kleinere Bronchien, Bronchiolen und besonders terminale Bronchiolen waren damit völlig verstopft. Die Alveolen der injizierten und kaudalen Lungenteile, ganz besonders in den Fällen, wo die weiter oben beschriebenen makroskopischen Konsistenzveränderungen vorlagen, enthielten CMC sogar in solchen Mengen, dass sie als grosse, einheitliche Gebiete bis zu ungefähr die Hälfte der betreffenden Lungenschnittfläche ausmachen konnten. Am meisten schienen die peribronchialen und subpleuralen Teile CMC zu enthalten. Die Lungenalveolen der Tiere der Hauptserie III schienen weniger CMC zu enthalten als die der anderen Serien.

*Hyperämie des Lungengewebes.* In den Lungen der Tiere sämtlicher Serien trat vom ersten Tag nach der Injektion an Hyper-



ämie in Form von Alveolarseptenverdickung und von Kongestion auf, am stärksten in injizierten, in kaudalen und in perihilären Teilen. Sie war hochgradiger als bei Tieren, die physiologische Kochsalzlösung erhalten hatten. Nach einem Tag war die Hyperämie am geringgradigsten in der I a) — Nebenserie, wo sie fast ausschliesslich in injizierten Teilen vorhanden war und am stärksten in den Lungen der Hauptserie III. Wie bei der makroskopischen Betrachtung sah man bei der mikroskopischen Untersuchung Kulmination der Hyperämie nach 2 Tagen. Nach fünf Tagen war der Befund in der Hauptserie I ungefähr normal; in der Hauptserie II hatte die Hyperämie abgenommen und nach 10 Tagen war auch hier der Blutgehalt nahezu normal. An diesem Zeitpunkt war in der III a) — Nebenserie geringgradige Hyperämie vorhanden; in der III b) — Nebenserie war die Hyperämie nach 20 Tagen verschwunden.

In keinem Fall konnten Zeichen von Extravasation festgestellt werden.

*Die Zellreaktion in den Atemgängen und Alveolen.* Wenn in dieser Beziehung graduelle Unterschiede auch zwischen den einzelnen Tieren derselben Serie feststellbar waren, so war doch eine Regelmässigkeit der Zellreaktion festzustellen. Es traten auch einige erhebliche Abweichungen auf, welche weiter unten gesondert aufgeführt werden.

Sowohl in der Hauptserie II und III waren schon nach einem Tag in der Trachea, in Bronchien, Bronchiolen und Alveolen stellenweise reichlich Granulozyten, spärlich Rundzellen und im Vergleich zu den Leukozyten erheblich weniger sich schwach anfärbende mononukleäre Makrophagen. Stellenweise kamen Alveolen vor, die ausschliesslich Makrophagen enthielten. Die stärkste Zellreaktion war in den injizierten und kaudalen Teilen zu beobachten, aber grundsätzlich dieselbe Reaktion trat auch anderswo in Verbindung mit CMC auf. In den Atemgängen und Alveolen war auch schleimiges Sekret zu sehen.

Dagegen liess sich in der Hauptserie I nach einem Tag im Vergleich zu den Versuchstieren, die physiologische Kochsalzlösung erhalten hatten, nichts Abweichendes feststellen. Die Septumzellen der injizierten Gebiete wirkten zwar aufgetrieben, aber deren Inhalt färbte sich nicht deutlich metachromatisch.



Ausserdem traten in der I b) — Nebenserie in den grösseren Bronchien spärlich Granulozyten auf.

Nach zwei Tagen hatte in den Hauptserien II und III die Zahl der oben erwähnten Leukozyten und Makrophagen zugenommen, die der Makrophagen verhältnismässig mehr, und ausserdem war deren Inhalt deutlich metachromatisch. Besonders in den Teilen, in welche die Injektion erfolgt war, war sogar die Hälfte der Alveolen ausser mit CMC mit Zellen ausgefüllt, und dies war besonders dort der Fall, wo die oben beschriebenen Konsistenzveränderungen vorkamen.

Bei den Tieren der Hauptserie I traten zum selben Zeitpunkt spärlich Makrophagen auf und bei den Tieren der I b) — Nebenserie ausserdem von Granulozyten gebildete Gruppen in den Bronchien und spärlich Granulozyten und Rundzellen in den Alveolen.

Nach fünf Tagen wiesen alle Hauptserien ungefähr den gleichen Befund auf. Freie, d.h. extrazelluläre CMC war weniger zu sehen. Die Makrophagenreaktion war noch immer ziemlich stark, aber die Granulozyten und Rundzellen waren deutlich weniger geworden; besonders in den Alveolen waren sie in der Minderheit. Auch gab es reichlich solche Alveolen, in denen ausschliesslich Makrophagen vorkamen. Nach zehn Tagen waren die Granulozyten und Rundzellen praktisch verschwunden. Trotz der starken Makrophagenreaktion kamen auch in den injizierten Teilen einige Alveolen vor, die ausschliesslich CMC enthielten. Besonders in subpleuralen und peribronchialen Teilen fanden sich grosse luftleere Gebiete, deren Alveolen CMC und teilweise vakuolisierte Makrophagen enthielten. In der Hauptserie I enthielten Trachea und grössere Bronchien keine CMC mehr.

Nach zwanzig Tagen war besonders die in den mittleren und kranialen Teilen enthaltene CMC merklich weniger geworden. Bei der Hauptserie II liess sich in den Bronchien kein fremder Inhalt mehr feststellen und bei der Hauptserie III nach dreissig Tagen nicht mehr. Nach diesem Zeitpunkt trat allgemein in den nichtinjizierten Lungen kein CMC mehr auf. Die Makrophagen waren teilweise kernlos und septumständig.

Nach fünfzig Tagen war die extrazelluläre CMC derart weniger geworden, dass sie praktisch nur noch in den kaudalen

Teilen der injizierten Lunge vorhanden war, wo die Makrophagen in den Alveolen zum grössten Teil septumständig und kernlos waren.

Nach siebzig Tagen verteilten sich die Fälle, in deren Lungen überhaupt keine extrazelluläre CMC mehr vorhanden war, folgendermassen auf die verschiedenen Serien: I a): 1, II a): 2, II b): 1 und III a): 2. Dagegen muss erwähnt werden, dass z.B. in zwei Fällen der II b) — Nebenserie ungefähr die Hälfte der Alveolen der mittleren und kaudalen Teile der injizierten Lunge CMC und teilweise im Zerfall befindliche Makrophagen enthielt. Bei zwei Tieren der III b) — Nebenserie lag sonst derselbe Befund vor, aber auch viele terminale Bronchiolen enthielten noch reichlich CMC und Makrophagen.

Nach fünf Monaten traten in der Hauptserie I in den kaudalen Teilen der injizierten Lungen im Bereich subpleuraler und peribronchialer Gebiete kleine Alveolargruppen auf, deren Alveolen spärlich schwach metachromatisch sich färbende, septumständige Makrophagen enthielten, aber in keiner konnte extrazelluläre CMC festgestellt werden.

Bei einer Ratte der II a) — Nebenserie enthielt ein subpleurales Gebiet auch noch reichlich CMC-Tröpfchen sowie zerfallende Makrophagen. Zwei andere Fälle boten sonst ein gleiches Bild wie die gerade beschriebenen Fälle der Hauptserie I, aber bei einem hiervon kamen auch einige CMC-Tröpfchen enthaltende Alveolen vor. Dagegen wichen die Lungen der Tiere der II b) — Nebenserie nur insofern von den der Kontrolltiere ab, dass in zentralen und peripheren Lymphknoten metachromatisch sich anfärbender Stoff spärlich vorhanden war.

In den beiden Nebenserien der Hauptserie III fand sich nur ein Tier, bei dem einige Alveolen des injizierten Lungenteiles ein paar CMC-Tröpfchen enthielten.

Nach acht Monaten waren nur bei je einem Tier der Nebenserien I a) und I b) ein paar Alveolengruppen, in deren Alveolen sich spärlich septumständige, zerfallende Makrophagen fanden.

In zwei Fällen der II a) — Nebenserie kamen in entsprechenden Lungenteilen sogar umfangreiche subpleurale und peribronchiale Gebiete vor, die zusammen etwa  $\frac{1}{4}$  der Schnittfläche durch diesen Lungenteil ausmachten und deren Alveolen reich-

lich CMC und zerfallende Makrophagen enthielten. Die kaudalen Abschnitte der injizierten Teile in der II b) — Nebenserie zeigten denselben Befund.

Die Tiere der Hauptserie III wiesen den entsprechenden Befund auf wie die Tiere der II b) — Nebenserie, aber ausser den Makrophagen kamen hier und da einige CMC-Tröpfchen vor, reichlicher in der b) — als in der a) — Nebenserie.

Nach einem Jahr konnte man bei den Tieren der Hauptserie I nichts vom Befund normaler, intakter Ratten Abweichendes feststellen. Die Zahl der Makrophagen übertraf nirgends die Zahl der bei den Kontrolltieren angetroffenen, und der Inhalt der Makrophagen färbte sich nicht metachromatisch.

In der II a) — Nebenserie war die Zahl der Makrophagen in den kaudalen Teilen der injizierten Lungen etwas grösser als normal, der grösste Teil davon septumständig, aber auch deren Inhalt färbte sich nicht deutlich metachromatisch. Der Befund zweier Tiere der II b) — Nebenserie entsprach dem normaler, aber in den kaudalen Teilen beider Lungen des dritten Tieres waren kleine Alveolengruppen, die zerfallende, schwach metachromatisch sich anfärbende Makrophagen enthielten. Ausserdem war in einigen terminalen Bronchiolen spärlich CMC.

Bei den Tieren der Hauptserie III enthielten die Alveolen der injizierten Teile ein klein wenig mehr zerfallende Makrophagen als normal sowie einige CMC-Tröpfchen, welche in der b) — Nebenserie etwas zahlreicher waren als in der a) — Nebenserie.

#### VON DEN BESCHRIEBENEN, ALS REGELMÄSSIGE FOLGE DER INJEKTION ANZUSEHENDEN LUNGENGeweBSREAKTIONEN ABWEICHENDE BEFUNDEN

Im ganzen bei 35 (= 17.6 %) der 198 CMC erhaltenen Ratten kamen in den Lungen solche, oft beim selben Tier verschiedenartige Veränderungen vor, die man nicht mit den oben beschriebenen, mit der CMC-Resorption in Zusammenhang stehenden Vorgängen in Einklang stehend ansehen kann, sondern die man wenigstens zum Teil für eine Komplikation nach erfolgter CMC-Injektion halten kann. Zahlenmässig ver-

teilten sich diese Tiere folgendermassen auf die verschiedenen Serien:

I a): 4 Fälle	II a): 5 Fälle	III a): 8 Fälle
I b): 1 »	II b): 8 »	III b): 9 »
Zus.: 5 Fälle	13 Fälle	17 Fälle

Die folgende Tabelle enthält die abweichenden Lungenbefunde in Gruppen eingeteilt sowie die zahlenmässige Verteilung dieser Gruppen auf die verschiedenen Serien.

Art der Veränderungen	Serie					
	I a)	I b)	II a)	II b)	III a)	III b)
Wahrscheinlich durch mechanische Läsion bedingte Veränderungen	2	1	3	6	4	8
Bronchitis oder Peribronchitis	3	—	2	2	4	2
Reaktive Veränderungen des Bindegewebes	2	—	1	1	1	—
Reaktive Veränderungen der Pleura	—	—	—	2	—	—

#### WAHRSCHEINLICH DURCH MECHANISCHE LÄSION BEDINGETE VERÄNDERUNGEN

*Durch offenes Reißen der Alveolarsepten* entstandene, ziemlich kleine, bis zu ungefähr 10 Alveolen umfassende Hohlräume fanden sich im ganzen bei 10 Tieren im injizierten Lungenteil. CMC und Makrophagen waren sowohl in den Hohlräumen als auch in den sie umgebenden Alveolen festzustellen. In acht Fällen kamen an dieser Stelle keine entzündlichen Veränderungen und auch keine reaktiven Veränderungen des Bindegewebes vor. Von diesen acht Fällen kamen auf die

II b) — Nebenserie: 4 Fälle (nach 1 und 10 Tagen, 2 nach 70 Tagen)

- III a) — Nebenserie: 2 » (nach 20 Tagen und nach 5 Monaten)  
 III b) — Nebenserie: 2 » (nach 30 und nach 70 Tagen)

Dagegen waren die fraglichen Hohlräume bei einem nach 10 Tagen getöteten Tier der II b) — Nebenserie und bei einem nach einem Jahr getöteten Tier der III a) — Nebenserie in einem Gebiet gelegen, in dessen Bereich reichlich peribronchitische Veränderungen vorkamen und dessen Bindegewebe vermehrt und im Begriff war homogen zu werden. Im erstgenannten Fall waren auch reaktive Veränderungen der Pleura vorhanden, über die weiter unten berichtet wird.

*Ungewöhnlich weite Bronchien* fanden sich in 6 Fällen und in einem hiervon (Nr. 3) kamen auch Bronchiolen vor, die weiter als normal waren. Diese Fälle wurden in den verschiedenen Serien zu folgenden Zeitpunkten angetroffen

Nr. 1 in der	I a) — Nebenserie	nach 50 Tagen
Nr. 2 » »	I b) — »	» einem Jahr
Nr. 3 » »	II a) — »	» 50 Tagen
Nr. 4 » »	II b) — »	» 5 Monaten
Nr. 5 » »	III a) — »	» 8 »
Nr. 6 » »	III b) — »	» 50 Tagen

Die Fälle Nr. 1 und Nr. 4 stimmten insofern überein, dass bei beiden im injizierten Lungenteil ein Bronchus mit ziemlich weitem Lumen vorkam, der teilweise von intaktem Bronchialepithel, teilweise vom einreihig sich fortsetzenden Zylinderepithel und teilweise von bloßem atelektatischen Lung parenchym bekleidet wurde. Ein in dieser Hinsicht gleicher Befund lag auch bei Nr. 5 vor, aber hier kam überhaupt kein intaktes Epithel vor. In den drei übrigen Fällen war das Bronchialepithel intakt. Für alle war gemeinsam das Auftreten starker peribronchitischer Veränderungen in Verbindung mit den erweiterten Bronchien. Mit Ausnahme des Falles Nr. 6 trat bei allen anderen neben entzündlichen Veränderungen Zunahme der kollagenen Bindegewebsfasern und deren Homogenisation auf. Nur bei einem Tier (Nr. 6) sah man in dem Bronchus kleine CMC-Tropfen, dagegen waren unter den peribronchialen Alveo-

len aller Tiere solche, die sowohl CMC als auch Makrophagen enthielten.

*Atelektase einer Lunge oder eines Lungenlappens*, welche bereits makropiskopisch festgestellt werden konnte, lag im ganzen in 7 Fällen vor, und in zwei Fällen trat gleichzeitig *Emphysem* der anderen Lunge auf, ohne dass sichere entzündliche Veränderungen feststellbar waren. Alle diese Fälle sind in der folgenden Tabelle angeführt.

Serie und Zeitpunkt	Fallzahl	Atelektatischer Teil	Emphysematischer Teil	Lage des Katheters
II a)				
n. 10 Tagen	1	r. Mittellapp. teilw. r. Unterlapp.	l. Lunge	Im Bereich d.r. Lunge
n. 10 Tagen	1	l. Lunge	r. Unter- u. Medianlapp.	In der Mitte
III b)				
n. 1 Tag	1	r. Mittel- u. Med.lapp.		Im Bereich d.r. Lunge
n. 2 Tagen	1	r. Med.lapp. u. l. Lunge		In d. Mitte
n. 20 »	1	r. Mittel-u. Med. lapp.		Im Bereich d.r. Lunge
n. 30 »	1	»		»
n. 70 »	1	r. Med. lapp.		In d. Mitte

Für die atelektatischen Gebiete war gemeinsam, dass in deren Bronchien, Bronchiolen und Alveolen nur spärlich kleine CMC-Tropfen, Makrophagen und hier und da ein Granulozyt vorkamen. Die emphysematischen Teile zeigten einen entsprechenden Befund, jedoch in geringerem Ausmass.

#### BRONCHITISCHE UND PERIBRONCHITISCHE VERÄNDERUNGEN

Eine eigene Gruppe bilden die 13 Fälle, in denen in der injizierten Lunge oder im kaudalen Teil der anderen Lunge

In der unterstehenden Tabelle sind die 13 Fälle mit Bronchitis und Peribronchitis zusammengefasst.

Nr.	Serie und Zeitpunkt	Zahl der Fälle		Bemerkungen
		Bronchitis	Peribronchitis	
	I a)			
1	n. 7 Tagen		1	
2	n. 70 »	1		
3	n. 1 Jahr		1	Im anderen Lobus derselben Lunge ein ungewöhnlich weiter Bronchus, was bereits erwähnt.
	II a)			
4	n. 8 Monat.		1	Veränderungen in kaudalen Teilen
5	n. 1 Jahr		1	beider Lungen
	II b)			
6	n. 10 Tagen		1	Es handelt sich um den kran. Teil d. injiz. Lunge, wo auch zerrissene Alveolarsepten sowie Veränderungen d. Pleura
7	n. 70 »	1		
	III a)			
8	n. 10 Tagen		1	Es handelt sich um d.r. Oberlapp., wo Veränderungen auf weitem Gebiet
9	n. 30 »		1	Mehrere Gebiete, wo Peribronchitis
10	n. 8 Monat.		1	»
11	n. 1 Jahr		1	
	III b)			
12	n. 10 Tagen		1	Mehrere Gebiete, wo Peribronchitis
13	n. 50 »		1	Veränderungen in med. u. unt. Lappen der r. Lunge.

und in einigen Fällen auch in kranialen Abschnitten auf Bronchitis oder Peribronchitis hinweisende Veränderungen auftraten. In Zusammenhang mit der Bronchitis enthielten irgendein oder



auch mehrere Bronchien besonders reichlich Eiterzellen, und in deren Epithel fanden sich stellenweise Zeichen von Nekrotisierung. Ausserdem kam im peribronchialen Lung parenchym Hyperämie vor. In den Fällen mit Peribronchitis waren in den Bronchiolen und Alveolen des umgebenden Lungengewebes ebenfalls ziemlich reichlich Granulozyten, welche teilweise die Alveolarsepten infiltriert hatten. In beiden Fällen kamen in den Alveolen auch metachromatisch sich färbende Makrophagen und Abhängig vom Zeitpunkt auch CMC vor. Dagegen enthielten die Bronchien kein CMC. Wie bereits erwähnt (S. 33), konnten in den Fällen, wo vom Präparat eine Bakterienfärbung ausgeführt wurde, keine Bakterien festgestellt werden.

Die dieser Gruppe zugehörigen Fälle verteilten sich folgendermassen:

I a): 3 Fälle	II a): 2 Fälle	III a): 4 Fälle
I b): 0 »	II b): 2 »	III b): 2 »
Zus.: 3 Fälle	4 Fälle	6 Fälle

Diese Zahlen enthalten nicht die in Zusammenhang mit den aussergewöhnlich weiten Bronchien beschriebenen Fälle, bei denen auch Peribronchitis vorkam.

Wenn man den Zeitpunkt mit berücksichtigt, könnten die Fälle Nr. 1, 6, 8 und 12 der Gruppe mit regelmässigen, durch CMC-Injektion bedingten Reaktionen des Lungengewebes angehören, aber in allen diesen Fällen lagen auf Peribronchitis hinweisende Veränderungen in einem solchen Ausmass vor, dass sie dieser Gruppe zugehört werden mussten.

#### REAKTIVE VERÄNDERUNGEN DES BINDEGEWEBES

In fünf Fällen trat deutliche Bindegewebsreaktion auf. Die Verteilung dieser Fälle auf die verschiedenen Serien war wie folgt:

I a): 2 Fälle	II a): 1 Fall	III a): 1 Fall
I b): 0 »	II b): 1 »	III b): 0 »
Zus.: 2 Fälle	2 Fälle	1 Fall

Die folgende Tabelle enthält diese Fälle mit reaktiven Veränderungen des Bindegewebes.

Nr.	Serie u. Zeit	Fallzahl	Bemerkungen
1	I a) n. 50 Tag.	1	Unter den Fällen mit ungewöhnlich weiten Bronchien als Nr 1 erwähnt.
2	n. 1 Jahr	1	Wie oben, jedoch als Fall Nr. 2.
3	II a) n. 50 Tag.	1	Wie oben, jedoch als Fall Nr. 3.
4	II b) n. 5 Monat.	1	Wie oben, jedoch als Fall Nr. 4.
5	III a) n. 1 Jahr	1	Es handelt sich um den r. Oberlappen, in dem durch Einreissen der Alveolarsepten entstandene Hohlräume.

Für vier Fälle (Nr. 1, 2, 3, und 4) war somit gemeinsam, dass die Veränderungen im kaudalen Teil der injizierten Lunge vorkamen, wo sich ausserdem aussergewöhnlich weite Bronchien fanden. Diese gab es zwar nicht beim Fall Nr. 5, aber statt dessen durch wahrscheinliches Einreissen der Alveolarsepten entstandene Hohlräume.

Die durch CMC verursachten Bindegewebsveränderungen werden allgemein für sehr wichtig erachtet, weshalb jeder dieser Fälle noch eingehender beschrieben wird.

Nr. 1: Es war ein ziemlich weiter, teilweise epithelloser Bronchus vorhanden, der von allen Seiten von dichtem, atelektatischem Lungengewebe umgeben wurde. In den Bronchien kamen grosse Granulozytenmassen vor, unter denen sich bereits autolytierte Granulozyten befanden. Auch in den atelektatischen Alveolen kamen Granulozyten vor, aber eine nennenswerte Eiterzellinfiltration war im Lungenparenchym nicht zu sehen. In den Alveolen waren ausserdem reichlich metachromatisch sich färbende, vakuolisierte Makrophagen vorhanden. Die Zahl

der kollagenen Bindegewebsfasern des Lungengewebes war merklich vermehrt. Besonders in der Richtung wo kein Epithel vorhanden war, sah man im Parenchym zahlreiche Granulombildungen, in denen neben teilweise im Zerfall befindlichen Granulozyten und kollagenen Bindegewebsfasern basophile Partikel enthaltende, mehrkernige Riesenzellen sowie Plasmazellen vorhanden waren.

Nr. 2: In einem erweiterten, aber mit anscheinend intaktem Epithel versehenen Bronchus sowie in erweiterten Bronchiolen waren ziemlich reichlich Granulozyten und in den Bronchiolen auch CMC und Makrophagen vorhanden. Das peribronchioläre Lungenparenchym war atelektatisch, dessen kollagene Bindegewebsfasern waren zahlenmässig vermehrt und wiesen Zeichen der Homogenisation auf. Ausserdem fanden sich darin zahlreiche Fibrozyten, Mastzellen mit metachromatisch sich färbendem, körnigem Inhalt sowie auch einige Fremdkörperriesenzellen.

Nr. 3: In erweiterten, aber mit intaktem Epithel versehenen Bronchien war reichlich Inhalt vorhanden, auf Grund der Färbung handelte es sich hierbei wahrscheinlich um Bronchialschleim, in dem einige Granulozyten und Rundzellen vorkamen. Das peribronchiale Lungengewebe war atelektatisch, und dessen kollagene Bindegewebsfasern waren vermehrt. In den Alveolen fanden sich reichlich vakuolisierte Makrophagen mit metachromatisch sich färbendem Inhalt.

Nr. 4: Nahezu die gesamte Durchschnittsfläche wurde von zwei bemerkenswert grossen Hohlräumen ausgefüllt, die teilweise ohne Bronchialepithelauskleidung waren und fast völlig mit zerfallenden Granulozyten gefüllt waren. Das umgebende Lungengewebe war komprimiert, das kollagene Bindegewebe der Alveolen war stark vermehrt und homogenisiert. In den Alveolen waren CMC-Tröpfchen, zerfallende Makrophagen und einige Granulozyten. An einigen Stellen fanden sich mit Granulozyten infiltrierte Alveolarsepten.

Nr. 5: Auch in den grössten Bronchien waren sehr reichlich autolytierte Granulozyten vorhanden, und an einigen Stellen wies das Bronchialepithel Zeichen der Nekrotisierung auf. Das peribronchiale Lungengewebe war stark atelektatisch, und stellenweise war der alveoläre Aufbau fast verschwunden. Besonders

die subpleuralen Alveolen, in deren Bereich durch offenes Reissen der Alveolarsepten entstandene Hohlräume vorkamen, enthielten reichlich Granulozyten, ausserdem CMC und zerfallende Makrophagen. Das kollagene Bindegewebe der Septen hatte zugenommen und begann homogen zu werden. Stellenweise fanden sich kleine Granulozytenansammlungen, in deren Mitte eine kleine Makrophagengruppe vorkam.

#### REAKTIVE VERÄNDERUNGEN DER PLEURA

Bei zwei Tieren der II b) -- Nebenserie (nach 10 Tagen und nach einem Jahr) traten offensichtliche reaktive Veränderungen der Pleura auf, die im Folgendem beschrieben werden. Der zuerst genannte Fall ist sowohl unter den Fällen angeführt, die in Zusammenhang mit den durch Reissen der Alveolarsepten entstandenen Hohlräumen besprochen wurden, als auch unter den Fällen mit peribronchitischen Veränderungen.

Erster Fall: Im oberen Teil der betreffenden linken Lunge fanden sich im Zusammenhang mit einem subpleuralen Bronchus starke peribronchitische Veränderungen, und ausserdem enthielten die Alveolen dieses Gebietes reichlich metachromatisch sich färbende Makrophagen. Ganz subpleural war ein Hohlraum von der Grösse einiger Alveolen, der möglicherweise durch Reissen von Alveolarsepten entstanden und mit Granulozyten gefüllt war. Die Pleura war an dieser Stelle merklich verdickt und reichlich vaskularisiert, ihr kollagenes Bindegewebe war deutlich vermehrt, und ausser Makrophagen enthielt sie auch Plasmazellen. Ausserdem fanden sich in der Pleura ziemlich grosse, mit Endothel ausgekleidete und auf Grund der Färbung CMC enthaltende Hohlräume. In den übrigen Teilen derselben Lunge waren keine nennenswerten Parenchymveränderungen vorhanden, aber die Pleura war stellenweise verdickt und zeigte die gerade beschriebenen Veränderungen. Im Parenchym der rechten Lunge wurde auch nichts Besonderes beobachtet, aber ihre Pleura zeigte an vielen Stellen den gleichen Befund wie die der linken Lunge.

Der zweite Fall: Im unteren Abschnitt der Lunge, in der der Katheter sich befunden hatte, war in einem terminalen Bron-

chilus schwach metachromatisch sich färbender Stoff und darin mehrere kernlose Makrophagen. Die Pleura war an dieser Stelle stark verdickt, ihr kollagenes Bindegewebe vermehrt, und sie enthielt viele mit platten endothelialen Zellen ausgekleidete Hohlräume, in denen auf Grund der Färbung deutlich CMC vorhanden war.

## BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Nach der Einführung im Jahre 1948 (Morales und Heiwinkel) hat die CMC eine umfangreiche Verwendung als Mittel zur Steigerung der Viskosität von Bronchographiekontrastmitteln gefunden. Über die Resorption und die durch CMC möglicherweise verursachten Lungengewebsschäden sind jedoch einander widersprechende Ansichten vorgebracht worden. Auf Grund von Tierversuchen halten Hellström und Holmgren (1949), Zollinger (1951), Hentel, Cohen und Brandenstein (1952), Weber und Löhr (1953) sowie Schmidtmann und Anger (1954) die Resorption von CMC für sehr schnell und haben dabei keine Komplikationen beobachtet. Dagegen stellten Vischer (1951), Werthemann und Vischer (1951) fest, dass CMC ziemlich langsam resorbiert wird, und die zuletzt genannten beobachteten auch reaktive Veränderungen des Bindegewebes. Zollinger und Fischer (1953) stellten bei 10 % der Versuchstiere CMC-Granulome fest. Hellström (1953) äussert die Ansicht, dass das Auftreten von Komplikationen von der Qualität der angewandten CMC abhängig sei. An klinischem Material konnten Morales und Heiwinkel (1948), Fischer (1950), Norris und Stauffer (1954) sowie Bessler (1955) nach Durchführung von Bronchographien keine Komplikationen beobachten. Zollinger (1951) konnte auch bei einer histologischen Nachuntersuchung keine Veränderungen feststellen, die man als durch CMC verursacht hätte ansehen müssen. Dagegen haben Vischer (1951), Schmidtmann und Dick (1952), Zollinger und Fischer (1953) sowie Hess (1954) auf Grund von Operations- und Obduktionsmaterial Bildung von CMC-Granulomen beschrieben.

Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen können verschiedene Gründe haben. Für Operations- und Obduktionsmaterial ist gemeinsam, dass es sich hierbei nicht um primär

intaktes Lungengewebe handelt. Einige Forscher haben bei ihren Versuchen sogar nebeneinander verschiedenartige Versuchstiere benutzt, z.B. Kanichen und Meerschweinchen, wo doch die letzteren in Bezug auf den Bau des Lymphgewebes und möglicherweise auch in Bezug auf dessen Reaktionsart von den anderen als Versuchstiere benutzten Nagetieren abweichen. Die Zahl der benutzten Versuchstiere hat von 9 bis 147 variiert und die Beobachtungszeit ebenfalls von 2 Wochen bis 18 Monaten. Ausserdem haben Unterschiede in der Zusammensetzung und Qualität der injizierten Lösungen bestanden: Einige Forscher haben eigentliche für die Bronchographie vorgesehene Kontrastmittel angewandt, andere reine CMC-Lösungen, wobei sie Qualität und Eigenschaften der benutzten CMC nicht erwähnen. Diese Tatsache ist bedeutungsvoll, da wie Fischer (1948) und Hellström (1953) erwähnen, verschiedene CMC-Fabrikate unterschiedliche Eigenschaften haben. Ausserdem gibt keiner der oben angeführten Autoren Konzentration oder Viskosität der benutzten CMC-Lösungen an. Man gewinnt auch den Eindruck, als hätten einige Untersucher sich möglicherweise bei der histologischen Untersuchung auf denjenigen Lungenteil beschränkt, wo die Katheterspitze sich im Augenblick der Injektion befunden hat.

Mit Ausnahme von Zollinger (1951), der die intrapulmonale Injektion perkutan ausführte, haben alle erwähnten Autoren zur Durchführung der Injektion die Tiere tracheotomiert, was zusammen mit der Äthernarkose die Sterblichkeit der Tiere erhöhen mag (Werthemann und Vischer, 1951). Wie bereits erwähnt wurde, starb keins der zur vorliegenden Untersuchung benutzten Tiere infolge der intratrachealen (-bronchialen) Injektion. Möglicherweise wurde dies durch Anwendung der unblutigen Injektionstechnik nach Nungester und Jourdonais (1935), durch intraabdominellen Applikationsweise des Narkosemittels sowie durch die mit Antibiotika durchgeführte Infektionsprophylaxe erreicht.

Bei der vorliegenden Untersuchung wurden intratracheal zwei Injektionsmengen benutzt: 0.1 und 0.2 ccm/100 g Körpergewicht der Ratte. Beide Mengen sind, auf das Rattengewicht bezogen, verhältnismässig grösser als die bei der Bronchographie des Menschen benutzten Mengen. Die erste Dosis stimmt mit



der von allen oben erwähnten Autoren allgemein angewandten überein. Mit der letzteren, der grösseren, sollte eine sogenannte »periphere Füllung« erreicht werden, d.h. ein Eindringen der injizierten Lösung bis in die Bronchiolen und Alveolen. In einer Füllung dieser Art hat man (Zollinger und Fischer 1953, Weber und Löhr 1953) einen Grund für die durch CMC verursachten Lungenveränderungen gesehen. Da sie bei der Durchführung einer Bronchographie beim Menschen nicht immer vermieden werden kann, mag ihr auch praktische Bedeutung zukommen.

Beim Vergleichen der Lungenbefunde im Zusammenhang mit den in Bezug auf die Viskosität verschiedenen CMC-Lösungen, d.h. der Lungenbefunde in den verschiedenen Hauptserien, wären gerade hinsichtlich der »peripheren Füllung« genaue quantitative Untersuchungen erforderlich gewesen. Da das Hauptziel der vorliegenden Arbeit jedoch der qualitative Nachweis von möglicherweise durch CMC verursachten Lungenveränderungen war, konnten mit der angewandten histologischen Technik keine verlässlichen und vergleichbaren quantitativen Ergebnisse über das Eindringen von CMC-Lösungen in die Alveolen und Bronchiolen erhalten werden.

Die Befunde der Tiere der b) — Gruppe der Kontrollserie I, bei denen nur die Kathetrisation durchgeführt wurde ohne Injektion irgendwelcher Lösung, waren mit den der intakten Kontrolltiere identisch, d.h. mit den Befunden der a) — Gruppe derselben Serie. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Weber und Löhr (1953) überein.

Auch die Lungenbefunde bei den Tieren der Kontrollserie II, die sterile, physiologische Kochsalzlösung erhalten hatten, entsprachen den Ergebnissen anderer Autoren (Hellström und Holmgren 1949, Weber und Löhr 1953). Vischer (1951) hat ebenfalls physiologische Kochsalzlösung zu Kontrollzwecken benutzt, erwähnt jedoch keine Ergebnisse.

Das verhältnismässig häufige Auftreten von Konsistenzveränderungen, nämlich in 20 Fällen von 198, kann teilweise durch die angewandte Technik und teilweise durch die verhältnismässig geringe Viskosität der benutzten CMC-Lösungen, welche auch eine Füllung der Bronchiolen und Alveolen herbeiführen kann, bedingt sein. Andererseits spricht die Tatsache, dass die Frequenz dieser Veränderungen überzeugend mit steigender

Viskosität anwächst, für die Bedeutung der Viskosität der Lösung. In diese Richtung weist auch das Auftreten der makroskopisch feststellbaren Atelektase lediglich in der Hauptserie III.

Da die bei der vorliegenden Untersuchung benutzten Lösungen kein Kontrastmittel enthielten, konnte mit der weiter vorn beschriebenen Röntgenuntersuchung (S. 26) nur ungefähr die Lage der Spitze des Katheters bestimmt werden. Auf Grund der histologischen Untersuchung scheint die Verteilung der CMC-Lösung auf die einzelnen Lungenteile auch in den verschiedenen Hauptserien ungefähr nach gleichen Gesetzen erfolgt zu sein (S. 72). Vorkommen von CMC nahezu ohne Ausnahme auch in anderen, nichtinjizierten Lungenteilen infolge von Regurgitation und Aspiration haben auch Hellström und Holmgren (1949) beschrieben, jedoch in geringerem Ausmass. Suffokation kam nicht vor, und auch in den grössten Bronchien waren keine diese verstopfende CMC-Massen zu sehen, nicht einmal in den b) — Nebenserien, deren Tiere die grössere Flüssigkeitsmenge erhalten hatten. In allen Hauptserien trat ebenfalls regelmässig und sogar verhältnismässig reichlich periphere, d.h. auch die Bronchiolen und Alveolen erfassende Füllung auf. Auch in dieser Hinsicht war kein bemerkenswerter Unterschied zwischen den a) — und b) — Nebenserien vorhanden. Es hatte jedoch den Anschein, als ob die periphere Füllung in den Fällen der Hauptserie III am geringradigsten gewesen wäre, was auch mit der grösseren Viskosität erklärt werden kann.

In grössten Teil der Fälle verursachte die Resorption von CMC nur vorübergehende Veränderungen in Form von Hyperämie, sowie von Makrophagen- und Leukozytenreaktion der Atemgänge und Alveolen. Diese Veränderungen befolgten gleiche Gesetzmässigkeit, welche auch andere Forscher in diesem Zusammenhang beschrieben haben. Die CMC-Resorption erfolgte am schnellsten in den Fällen der Hauptserie I, wo nach 5 Monaten keine extrazelluläre CMC mehr festgestellt werden konnte, und am langsamsten in den Hauptserien II und III, wo noch ein Jahr später kleine CMC-Mengen vorhanden waren. Dies spricht dafür, das die Resorption mit steigender Viskosität abnimmt, wohingegen die injizierte Lösungsmenge keinen nennenswerten Einfluss auf die Resorptionsgeschwindigkeit auszuüben scheint.

Die oben gemachten Angaben über die Resorptionszeit der CMC weichen von den anderer Untersucher ab. So geben Hellström und Holmgren (1949) an, dass die völlige Resorption von CMC eine Woche beansprucht habe, Zollinger (1951, nach Joduron B) 2 Wochen, Hellström (1953, nach Joduron B) 6 Monate, Weber und Löhr (1953, nach Per-Abrodil BR 60 %) viskös 28 Tage, Schmidtman und Anger (1954) 96 Tage, Vischer (1951) 4 Monate sowie Werthemann und Vischer (1951)  $1\frac{1}{2}$  Jahre.

Bei Betrachtung der Gruppe von 35 Fällen mit abweichenden Befunden, deren Veränderungen ihrer Art wegen zumindest zum Teil als durch CMC verursachte Komplikationen angesehen werden können, fällt auf, dass die Zahl der Fälle in der Hauptserie III mehr als 3 mal grösser war als in der Hauptserie I. Beim Vergleichen der die verschiedenen Lösungsmengen vertretenden a) — und b) — Nebenserien untereinander, verteilen sich die Fälle gleichmässig auf die verschiedenen Hauptserien. Es scheint daher, dass die Zahl der Fälle mit Komplikationen als Folge von CMC-Resorption mit steigender Viskosität der benutzten CMC-Lösung zunehme, aber dass die Lösungsmenge keinen Einfluss hierauf habe.

Die Frequenz der Fälle mit Komplikationen, im ganzen 17.6 % der Tiere, die CMC erhielten, erscheint hoch, aber sie kann nicht direkt mit den Ergebnissen anderer Forscher verglichen werden, da diese als Komplikationen nahezu ausschliesslich das Auftreten von Granulomen hervorgehoben haben.

Beim Vergleichen der verschiedenen Gruppen mit Komplikationen (Tabelle auf S. 77) kann zunächst festgestellt werden, dass die Gruppe am grössten ist, in der alle Fälle mit Veränderungen als wahrscheinliche Folge mechanischer Läsionen zusammengefasst sind. Zu dieser Gruppe gehörende Veränderungen sind am zahlreichsten in der Hauptserie III, weniger in der Hauptserie II und am wenigsten in der Hauptserie I vorhanden. Zwar sind die Zahlen der Fälle klein, aber andererseits sind die Unterschiede zwischen den Hauptserien offenbar. So kamen in der Hauptserie III 4 mal mehr derartige Fälle vor als in der Hauptserie I. Ausserdem ist bemerkenswert, dass sowohl in der II b) — als auch III b) — Nebenserie doppelt soviel solche Fälle vorkommen als in den entsprechenden a) — Nebenserien.

Somit ist wahrscheinlich, dass ausser der Viskosität der CMC-Lösung auch der Lösungsmenge, besonders in Zusammenhang mit grösserer Viskosität eine Bedeutung bei der Entstehung mechanischer Läsionen zukommt. Auf die Bedeutung der Viskosität bei dieser Gruppe weist auch die Tatsache, dass keins der Fälle, in denen durch offenes Reißen der Alveolarsepten entstandene Hohlräume (S. 77) oder Atelektase und Emphysem einer Lunge oder eines Lungenlappens vorkamen (S. 79), der Hauptserie I angehörte. Andererseits ist bemerkenswert, dass die Fälle mit aussergewöhnlich weiten Bronchien (6 Stück) sich gleichmässig auf Haupt- und Nebenserien verteilten.

Für das Auftreten von Atelektase und Emphysem war gemeinsam, dass keins von beiden mehr nach 70 Tagen festzustellen war.

Auch in der Gruppe mit entzündlichen Veränderungen (S. 79) verteilten sich die Fälle ziemlich gleichmässig auf die verschiedenen Hauptserien. Wegen der geringen Zahl der Fälle können keine sicheren Schlüsse gezogen werden, immerhin könnte die etwas grössere Zahl sowohl in der Hauptserie II als auch Hauptserie III auf die Bedeutung der Viskosität auch in Bezug auf entzündliche Veränderungen sprechen. Bezüglich der Zeit des Auftretens dieser Fälle kann keine Regelmässigkeit festgestellt werden. In keinem der dieser Gruppe angehörenden Fälle, in denen auch die Bakterienfärbung ausgeführt wurde, gelang es, Bakterien nachzuweisen.

Gemeinsam für die Gruppe mit reaktiven Veränderungen des Bindegewebes (S. 81) war, dass diese erst nach 50 Tagen auftraten. Die geringe Fallzahl — im ganzen 5 — und deren nahezu gleichmässige Verteilung auf die verschiedenen Hauptserien berechtigt wohl kaum irgendwelche Schlüsse betreffs der Bedeutung der Viskosität und noch weniger der Lösungsmenge zu ziehen. Bei allen fanden sich Zeichen von Lungenläsion: Bei vieren in Form eines aussergewöhnlich weiten Bronchus und bei einem in Form eines wahrscheinlich durch Reißen der Alveolarsepten entstandenen Hohlraumes. Mit Ausnahme eines Falles kamen bei allen anderen, stellenweise sogar starke entzündliche Veränderungen vor. Die kollagenen Fasern des Bindegewebes waren in allen Fällen stark vermehrt, und in drei Fällen war ausserdem deutliches Granulomgewebe vorhanden. Die in dieser Gruppe beschriebenen Veränderungen entsprechen nahezu der

von Hellström (1953) ebenfalls bei Ratten, aber nach Joduron B in 9 von 34 Fällen beobachteten inflammatorischen Reaktionen. Auch für die von ihm beschriebenen Veränderungen war gemeinsam, dass sie zusammen mit Gewebsläsionen, mit ektatischen Kavitäten, und zwar erst nach 3 Monaten auftraten. Bei der vorliegenden Untersuchung waren somit weniger reaktive Veränderungen des Bindegewebes festzustellen als bei der von Hellström, und das Auftreten von Granulomgewebe in drei Fällen von 198 ist ebenfalls deutlich geringgradiger, als wenn Zollinger und Fischer (1953) Granulomgewebe bei 2 von 21 Kaninchen nach Joduron B festgestellt haben.

Reaktive Veränderungen der Pleura (S. 84) liessen sich nur in zwei Fällen feststellen, die der Hauptserie II angehörten. Für beide war lediglich gemeinsam, dass auch hier sog. periphere Füllung eingetreten war; die Gründe oder der Entstehungsmechanismus dieser Komplikation werden somit nicht erhellt.

#### SCHLUSSVOLGERUNGEN

Zum Schluss kann auf Grund der Ergebnisse auf die Fragestellung der vorliegenden Arbeit (S. 23) Folgendes geantwortet werden:

1) Die Resorptionsgeschwindigkeit der CMC scheint in erster Linie von der Viskosität der benutzten CMC-Lösung abhängig zu sein, nicht von der Menge der injizierten CMC-Lösung. Somit wird die Resorption bei Steigen der Viskosität langsamer. Im grössten Teil der Fälle, wo die Reaktion des Lungengewebes für einen mit der Resorption zusammenhängenden regelmässigen, vorübergehenden Vorgang gehalten werden muss, kann man das Verschwinden der extrazellulären CMC folgendermassen vorsichgegangen ansehen: In der Hauptserie I, wo die Viskosität der benutzten CMC-Lösung 5 mal grösser als die von Wasser war, war die extrazelluläre CMC nach 5 Monaten verschwunden. Dagegen war in den Hauptserien II und III, in denen die Viskositäten der CMC-Lösungen 10 und 30 mal grösser waren als die von Wasser, extrazelluläre CMC noch nach einem Jahr vorhanden. Auf Grund der Färbung CMC-enhaltende Makrophagen fanden sich spärlich auch in den Fällen

der Hauptserie I noch nach 8 Monaten in injizierten Teilen. In den Fällen mit solchen Lungenveränderung, die wenigstens teilweise als durch CMC bedingte Komplikationen angesehen werden können, erfolgte die Resorption nicht nach den oben genannten Regeln.

2) Die Injektion von CMC ruft im grössten Teil der Fälle Lungengewebsreaktionen von vorübergehendem Charakter hervor, die man als regelmässige Resorptionserscheinung ansehen kann.

Ausserdem traten bei 35 (= 17.6 %) aller der Tiere die CMC-Lösung erhalten, derartige Lungengewebsveränderungen auf, die wenigstens zum Teil für durch CMC verursachte, mit deren Resorption in Zusammenhang stehende Komplikationen angesehen werden können.

3) Bei der als regelmässig anzusehende Resorption der CMC tritt im Anfangsstadium Hyperämie des Lungengewebes auf; in den Atemgängen und Alveolen erscheinen Leukozyten, und es kommt zu einer intensiveren und länger dauernden Makrophagenreaktion, welche ebenso lange anhält, wie extrazelluläre CMC nachzuweisen ist.

Die in den oben erwähnten 35 Fällen beobachteten Komplikationen können in vier Hauptgruppen eingeteilt werden: Veränderungen wahrscheinlich infolge mechanischer Läsion, bronchitische und peribronchitische Veränderungen, reaktive Veränderungen des Bindegewebes und reaktive Veränderungen der Pleura. Es ist zu bemerken, dass bei einem Tier verschiedene Veränderungen auftreten konnten, die zwei oder mehreren der gerade erwähnten Gruppen angehörten. Zur ersten Gruppe gehörige Veränderungen wurden in 24 Fällen angetroffen, zur zweiten Gruppe gehörige in 13 Fällen, zur dritten in 5 Fällen und zu der letzten Gruppe gehörige in 2 Fällen.

4) Auf Grund der erhaltenen Ergebnisse scheint es, dass bei auf regelmässig anzusehende Weise vor sich gehender CMC-Resorption, der Charakter der Resorptionsvorgänge sich nicht in Abhängigkeit von der Viskosität und der Menge der CMC-Lösung verändert.

Erst wenn mit der Resorption komplizierende Veränderungen verbunden sind, scheint die Frequenz der Komplikationen mit Zunahme der Viskosität der CMC-Lösungen anzusteigen. Nur



in der Gruppe mit Veränderungen als Folge mechanischer Läsionen mag auch die Menge der injizierten CMC-Lösung Einfluss auf die Frequenz der Veränderungen haben.

5) Da in der vorliegenden Untersuchung nahezu regelmässig sog. periphere Füllung, d.h. auch Füllung der Bronchiolen und Alveolen vorkam, kann die CMC-Lösung vor Ingangkommen der Resorption schädlich auf die Funktion der injizierten Lungenteile gewirkt haben. Ausserdem haben die in der Gruppe der 35 komplizierten Fälle beschriebenen Veränderungen offenbar hindernd auf die Funktion der betreffenden Lungenteile eingewirkt.

### ZUSAMMENFASSUNG

In der Literaturübersicht beschreibt der Verfasser älteste, sich auf intratracheale Applikation von Arzneilösungen gründende Erfahrungen sowie frühere Untersuchungen über die Physiologie und Pathologie der Resorption intratracheal verabfolgter Lösungen, von denen besonders die letzteren die Grundlage und die Möglichkeit für die Entwicklung der Bronchographie ergeben haben. Die Nachteile der bisher zur Bronchographie angewandten sog. Jodöle zum Ausgangspunkt nehmend beschreibt der Verfasser ferner Untersuchungen, die ausgeführt worden sind, um wasserlösliche Bronchographiekontrastmittel zu entwickeln und als deren Ergebnis Karboxymethylzellulose (CMC) als Mittel zur Erhöhung der Viskosität wasserlöslicher Kontrastmittel ausgewählt wurde. Da über die Wirkung dieses Stoffes auf das Lungengewebe einander stark widersprechende Ergebnisse veröffentlicht worden sind, wollte der Verfasser an Hand von Tierversuchen durch CMC möglicherweise verursachte Lungengewebsveränderungen näher untersuchen und besonders klären, welche Bedeutung der Viskosität und der Menge der angewandten CMC-Lösung hierbei zukommt.

Zu den Untersuchungen wurden im ganzen 245 weisse, durchschnittlich ungefähr 200 g schwere Ratten benutzt, denen die zu untersuchenden Lösungen intracheal (-bronchial) unblutig mit Hilfe der Laryngoskopie injiziert wurden, nachdem ein Narkosemittel intraperitoneal verabfolgt worden war. Vor der Injektion erhielten die Tiere prophylaktisch Antibiotika. Von



CMC, deren physikalische Eigenschaften erwähnt werden, wurden drei sterile Lösungen mit verschiedener Viskosität hergestellt. Viskositäten dieser Lösungen waren mit dem Viskositätsmesser nach Ubbelohde bei  $+ 37^{\circ}\text{C}$  bestimmt 5, 10 und 30 mal grösser als die von Wasser, und der CMC-Gehalt betrug entsprechend 0,8, 1,05 und 1,55 Gewichts %. Jede der Lösungen wurde an 66 Ratten injiziert, und zwar so, dass die Hälfte der Tiere 0,1 ccm und die andere Hälfte 0,2 ccm/100 g Körpergewicht erhielt. Somit zerfiel das 198 Ratten umfassende Tiermaterial, welches CMC erhielt, in drei Hauptserien und jede Hauptserie auf Grund der injizierten Menge in zwei Nebenserien. Aus jeder Hauptserie wurden jeweils 6 Tiere nach 1, 2, 5, 10, 20, 30, 50 und 70 Tagen sowie nach 5 und 8 Monaten und nach einem Jahr getötet. Für Kontrollversuche wurden im ganzen 47 Ratten verwendet, von denen 30 Tiere gleiche Mengen physiologische Kochsalzlösung erhielten wie die Versuchstiere CMC-Lösung. Die längste Beobachtungszeit bei den Kontrolltieren betrug 20 Tage. Bei fünf Ratten wurde kein intratrachealer Eingriff vorgenommen, und bei 12 Ratten wurde eine intratracheale »Kathetrisation« ohne Injektion irgendwelcher Lösung durchgeführt. Nach Einführung des Katheters wurde mit Hilfe der Röntgenuntersuchung bei allen Tieren versucht, die Katheterspitze ungefähr zu lokalisieren.

Zum Nachweis der CMC im histologischen Präparat wurde einerseits Toluidinblaufärbung und andererseits Perjodat-Leukofuchsinfärbung (nach McManus) angewandt.

Über die Ergebnisse der Untersuchungen ist zunächst zu erwähnen, dass keins der Tiere infolge des intratrachealen Eingriffs starb. Bei den Kontrolltieren konnten keine Veränderungen als Folge einer blossen Kathetrisation festgestellt werden. Nach der Injektion von physiologischer Kochsalzlösung trat eine weniger als 5 Tage dauernde mikroskopisch und auch makroskopisch feststellbare vorübergehende Hyperämie des Lungengewebes auf.

Auch nach der Injektion von CMC war eine makroskopische Hyperämie feststellbar, und ausserdem kamen bei 20 der 198 Tiere, die CMC erhalten hatten, Konsistenzveränderungen in den injizierten Lungenteilen vor, und zwar Zunahme der Festigkeit des kaudalen Abschnitts des betreffenden Lungen-

teiles. Dieser Art Veränderungen fanden sich am häufigsten in der Hauptserie III, wo die Viskosität der benutzten CMC-Lösung am grössten war.

In Bezug auf den mikroskopischen Befund konnten die CMC erhaltenen Tiere in zwei Gruppen eingeteilt werden: Erstens Tiere, bei denen die beobachteten Lungenveränderungen vorübergehend waren und somit als eine mit der CMC-Resorption regelmässig im Zusammenhang stehende Reaktion angesehen werden müssen, und zweitens Tiere, bei denen deutliche, wenigstens zum Teil durch die CMC-Injektion bedingte Komplikationen nachgewiesen werden konnten. Letztgenannte Veränderungen kamen in 35 Fällen vor = 17.6 % aller 198 Ratten, die CMC erhalten hatten.

Wenn die Resorption der CMC auf regelmässig anzusehende Art geschah, ohne komplizierende Veränderungen zu verursachen, stand die Resorptionsgeschwindigkeit in offensichtlichem Verhältnis zur Viskosität. So war die extrazelluläre CMC in den Fällen der Hauptserie I nach 5 Monaten verschwunden, aber in den Serien II und III waren Fälle, in denen sie noch nach einem Jahr vorhanden war. Die Menge der injizierten CMC-Lösung schien dagegen keine Bedeutung für die Resorptionsgeschwindigkeit zu haben.

Unabhängig von der Viskosität konnte in allen Hauptserien sog. periphere Füllung, d.h. auch der Bronchiolen und Alveolen, in solchem Ausmass festgestellt werden, dass man sie für die Regel halten muss.

Von den bereits erwähnten 35 Fällen mit ungewöhnlichen Befunden, kamen 5 auf die Hauptserie I, 13 auf die Hauptserie II, und 17 Fälle auf die Hauptserie III. Diese Lungenveränderungen können in vier Hauptgruppen eingeteilt werden: 1) Veränderungen wahrscheinlich als Folge von mechanischen Läsionen, 2) bronchitische und peribronchitische Veränderungen, 3) reaktive Veränderungen des Bindegewebes und 4) reaktive Veränderungen der Pleura. In vielen Fällen kamen beim selben Tier zwei oder mehreren Gruppen zugehörige Veränderungen vor. Veränderungen der Hauptgruppe 1 fanden sich in 24 Fällen, der Gruppe 2 in 13 Fällen, der Gruppe 3 in 5 und Veränderungen der Gruppe 4 in 2 Fällen.

Auf Grund dieser Ergebnisse scheint es offensichtlich, dass bei

Zunahme der Viskosität auch die Zahl der komplizierenden Lungenveränderungen zunimmt. Die Menge der CMC-Lösung scheint in dieser Beziehung keine Bedeutung zu haben; nur die Zahl der wahrscheinlich als Folge mechanischer Läsion entstandener Veränderungen mag mit Anstieg der CMC-Menge ebenfalls angestiegen sein.

Die Zahl der komplizierten Fälle in Zusammenhang mit der CMC-Resorption, 17.6 %, erscheint ziemlich hoch. Als ein Grund hierfür kann die in jeder Serie regelmässig eingetretene sog. periphere Füllung, d.h. auch Füllung der Bronchiolen und Alveolen, angesehen werden, die eine auch langdauernde CMC-Retention zur Folge haben kann. Die Ergebnisse lassen sich nicht direkt mit den Ergebnissen anderer Untersucher vergleichen, da diese in erster Linie Veränderungen des Bindegewebes Beachtung geschenkt haben.

## LITERATURVERZEICHNIS

- ALISON: zit. nach Gleitsmann 1905.
- ANDERSON, W. S.: Intratracheal Injections: Experimental and Clinical Study of Their Value in Diseases of the Lungs. — J. Michigan M. Soc. 1904:3:108.
- BARTON, J. L.: Intratracheal Medication in Diseases of the Respiratory Tract. — J. Tuberc. 1902:4:136.
- BÉCLÈRE & GUISEZ: Suppuration Gangreneuse Intrapulmonaire, Radiodiagnostic, Guérison par la Méthode des Injection Intra-bronchiale. — Bull. et mém. d. hôp. de Paris 1910:29:520.
- BENNETT, J. H.: On Injections of the Bronchi in Pulmonary Diseases. — Edinburgh M. J. 1857:29:389.
- BERGERON: zit. nach GLEITSMANN 1905.
- BESSLER, W.: Propylidone-Cilag-Suspension, ein neues Kontrastmittel für Bronchographie. — Fortschr. d. Röntgenstr. 1955:83:553.
- BEUTEL, A.: Bronchographie. — Röntgenpraxis. 1935:7:157.
- BEZANCON, F., DELARUE, J., & VALET-BELLOT, M.: Le Sort du Lipiodol dans le Parenchyme Pulmonaire Chez l'Homme. — Ann.d'anat. path. 1935:12:229.
- BOTEY, R.: zit. nach GLEITSMANN 1905.
- BRAIBANTI, T.: Ricerche sperimentali sulle modificazioni istologiche prodotte dagli olii iodati nell'apparato respiratorio. — Ann.di radiol. e fis.med. 1937:11:195.
- BRONNER, A.: Intra-laryngeal Injections in the Treatment of Diseases of the Larynx, Trachea and Bronchi. — Lancet 1894: April 28.:1062.
- BROWN, C. J., & HOUGHTON, A. A.: The Chemical and Physical Properties of Carboxymethyl cellulose and its Salts. — J. Soc. Chem. Ind. 1941:60:254.
- CAMERON, G. C., & LANG, J.: Immediate and Ultimate Effects of Silica in the Rabbit. — Tr. Roy. Soc. Canada 1933:27:173.
- CAMPBELL, C.: The Treatment of Respiratory Affections by Means of Large Medicinal Injections Through the Larynx. — Brit. M. J. 1894: Dec. 1.:1238.
- DECREQUY: Injection Intra-Pulmonaire D'Huiles Medicamenteuses par Voie Nasale. — Bull. d. Laryng., Otol. et Rhinol. 1907:10:200.
- DONELLAN, P. S.: Some Observations on Intracheal Injections in the Treatment of Chronic Respiratory Affections. — South. California Pract. 1908:23:50.
- DOUGLAS, W. R.: Reaction of Pulmonary Tissue to Lipiodol. — Am. J. Path. 1935:11:497.
- DOWNIE, J. W.: Intralaryngeal Injections in the Treatment of Certain Laryngeal and Pulmonary Affections. — Brit. M. J. 1891: April 18.:845.

- DRINKER, C. K.: Modern Views upon the Development of Lung Fibrosis. — J. Indust. Hyg. & Toxicol. 1922:3:295.
- DRINKER, C. K.: zit. nach GROSS & WESTRICK 1954.
- FARRIS, E. J., & GRIFFITH, J. Q. (Herausgeber): The Rat in Laboratory Investigation. — Philadelphia 1949.
- FISCHER, F. K.: Die Darstellung des Bronchialbaumes mit wasserlöslichem Kontrastmittel. — Schweiz. med. Wchnschr. 1948:42:1025.
- FISCHER, F. K.: Die Jodölbronchographie als schädigender diagnostischer Eingriff. — Schweiz. med. Wchnschr. 1950:11:273.
- FISCHER, F. K.: The Technique, Indications, and Results of Bronchography with a Water-soluble, Viscous Contrast Medium (Ioduron »B«). — Schweiz. med. Wchnschr. 1950:80:273.
- FISCHER, F. K.: Bronchialerkrankungen. — Im Lehrbuch d. Röntgendiagnostik. (Herausgeber: SCHINZ, H. R., BAENSCH, W. E., FRIEDL, E., & UEHLINGER, E.) — Stuttgart 1952.
- FLAINER, W.: Ueber die Resorption corpusculärer Elemente durch Lungen und Pleura. — Virchows Arch. f. path. Anat. 1888:112:97.
- FOUCHIER, M.: Les Injections Intra-Tracheales dans le Traitement de la Tuberculose. — Union med. du Canada 1906:35:455.
- GARDNER, L. U.: Studies on Experimental Pneumokoniosis. VIII. Inhalation of Quartz Dust. — J. Indust. Hyg. 1932:14:18.
- GERLACH, H. W., & FINKELDEY, W.: Zur Frage mesenchymaler Reaktionen. Die Beteiligung der Lunge an den Abwehrreaktionen des normalen und leistungsgesteigerten Organismus. — Krankheitsforschung 1926:4:29.
- GLEITSMANN, J. W.: Intratracheal Injections. — Med. Record. 1905:67:449.
- GREEN, H.: zit. nach BENNET 1857.
- GROSS, P., & WESTRICK, M.: The Permeability of Lung Parenchyma to Particulate Matter. — Am J. Path. 1954:30:195.
- HAYNES, F.: Experimental Dust Inhalation in Guinea-Pigs. — J. Hyg. 1931:31:96.
- HELLSTRÖM, B., & HOLMGREN, Hj.: The Reaction of the Lung on Bronchography with Viscous Umbradil (Umbradil-Viscös B) (Astra), Umbradil (Astra) and Carboxymethyl Cellulose. An experimental investigation on animals. Acta radiol. 1949:32:471.
- HELLSTRÖM, B.: The Reaction of the Lung on Bronchography with Water-soluble Contrast Media in Rats. Comparison between two media. — Acta radiol. 1953:40:371.
- HENTEL, W., COHEN, M. B., & BRANDENSTEIN, L. C.: Evaluation of Ioduron B in Bronchography. — Dis. of Chest 1952:21:280.
- HESS, R.: Die Lungenveränderungen nach Bronchographie mit carboxymethylcellulosehaltigen Kontrastmitteln. — Thoraxchirurgie 1954:1:499.
- HUBBARD, T.: zit. nach GLEITSMANN 1905.
- HUEPER, W. C.: Experimental Studies in Cardiovascular Pathology. Thesaurosis and Atheromatosis Produced in Dogs by the Repeated Intravenous Injection of Solution of Sodium Cellulose Glycolate. — Am. J. Path. 1945:21:1021.
- V. INS, A.: Einige Bemerkungen über das Verhalten des inhalierten Staubes in den Lungen. — Virchows Arch. f. path. Anat. 1878:73:151.

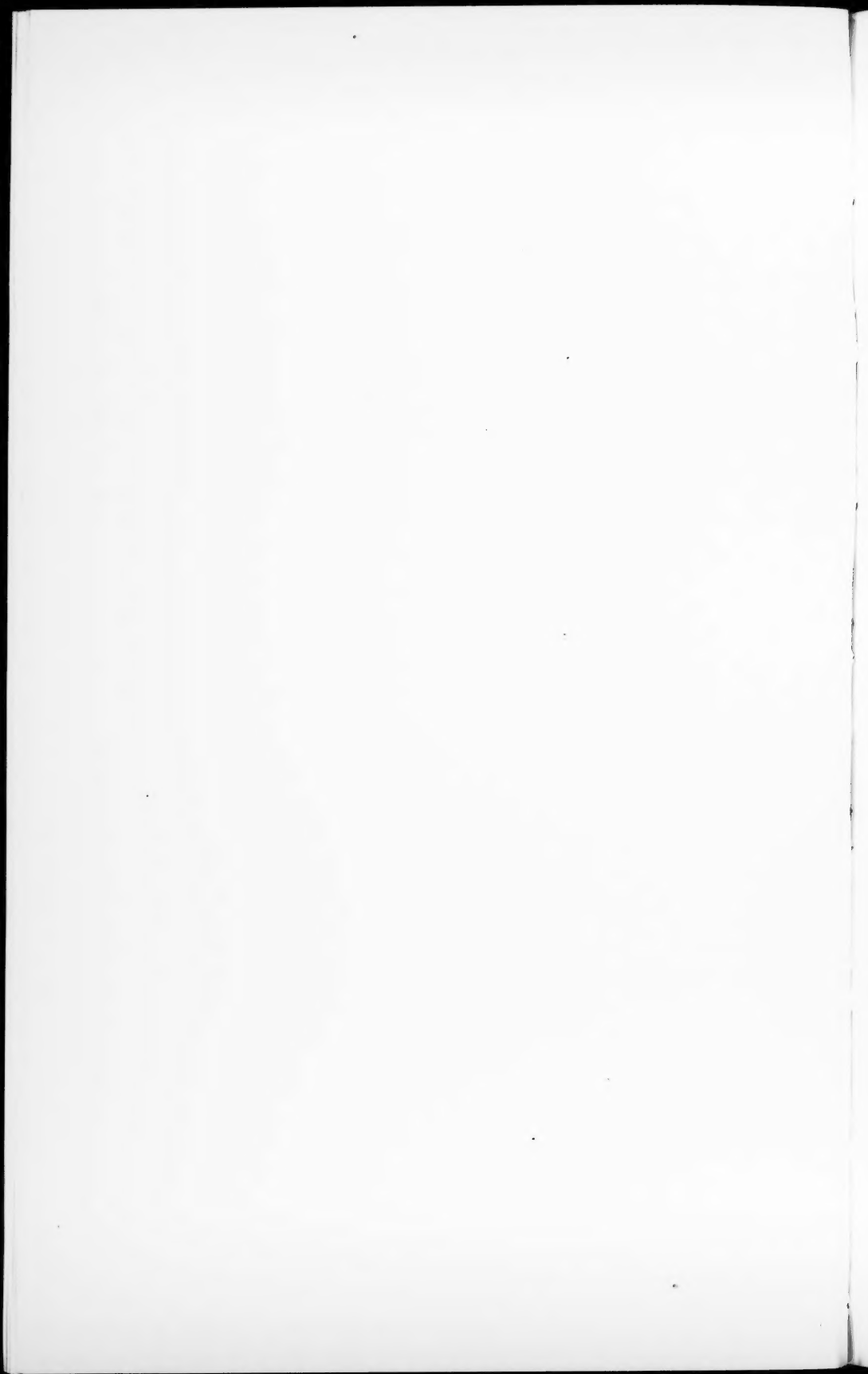
- JACKSON, Ch.: The Bronchial Tree; Its Study by Insufflation of Opaque Substances in the Living. — *Am. J. Roentgenol.* 1918:5:454.
- JACOB, P.: Über Lungeninfusionen. — *Deutsche med. Wchnschr.* 1904:30:1154.
- JAFFÉ, R. (Herausgeber): *Anatomie und Pathologie der Spontanerkrankungen der kleinen Laboratoriumstiere.* — Berlin 1931.
- JONES, F. S.: The Source of the Microorganisms in the Lungs of Normal Animals. — *J. Exper. Med.* 1922:36:317.
- KLOTS, O.: Pulmonary Anthracosis — a Community Disease. — *Am. J. Pub. Health* 1914:4:887.
- LAUCHE, A.: In der Anatomie und Pathologie der Spontanerkrankungen der kleinen Laboratoriumstiere. (Herausgeber: JAFFÉ, R.) — Berlin 1931.
- LEMON, W. S., & HIGGINS, G. M.: Pulmonary Fibrosis: Experiments of Short Duration. — *Am. J. M. Sc.* 1932:133:153.
- LILLIE, R. D.: *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry.* — New York 1954.
- LYNAH, H. L., & STEWART, W. H.: Roentgenographic Studies of Bronchiectasis and Lungabscess after Direct Injection of Bismuth Mixture through the Bronchoscope. *Am. J. Roentgenol.* 1921:8:49.
- MENDEL, H.: L'injection Tracheale Simplifiée. — *Arch. gen. de med.* 1899:1:165.
- MORALES, O.: Further Studies With Viscous-Umbradil (Umbradil-Viskös). Its indications and technical application. — *Acta radiol.* 1949:32:317.
- MORALES, O., & HEIWINKEL, H.: A Viscous, Water-Soluble Contrast Preparation. Preliminary Report. — *Acta radiol.* 1948:30:257.
- MUIR: zit. nach GLEITSMANN 1905.
- MURRAY: zit. nach GLEITSMANN 1905.
- NORRIS, Ch. M., & STAUFFER, H. M.: Aqueous Contrast Media in Bronchography. — *Ann. Otol., Rhin. & Laryng.* 1951:60:802.
- NORRIS, Ch. M., & STAUFFER, H. M.: Bronchography with Dionosil. — *Ann. Otol., Rhin. & Laryng.* 1954:63:520.
- NORRIS, Ch., M.: Persönliche Mitteilung 1954.
- NOTHNAGEL, H.: Zur Resorption des Blutes aus dem Bronchialbaum. — *Virchows Arch. f. path. Anat.* 1877:71:414.
- NUNGESTER, W. J., & JOURDONAIS, L.: Intratracheal Inoculations in the Rat. — *Science* 1935:81:74.
- PEIPER, E.: Ueber die Resorption durch die Lungen. — *Ztschr. f. klin. Med.* 1884:8:293.
- PENHALE, W.: zit. nach GLEITSMANN 1905.
- PERMAR, H. H.: An Experimental Study of the Mononuclear Phagocytes of the Lung. — *J. M. Research* 1920—21:42:9.
- PERL, L., & LIPMAN, H.: Experimenteller Beitrag zur Lehre von der Lungenblutung. — *Virchows Arch. f. path. Anat.* 1870:51:552.
- ROBERTSON, O. H.: Phagocytosis of Foreign Material in the Lung. — *Physiol. Rev.* 1941:21:112.
- ROBSON, W. D., IRWIN, D. A., & KING, E. J.: Experimental Silicosis: Quarts, Sericite and Irritating Gases. — *Canad. M. A. J.* 1934:31:237.
- ROMEIS, B.: *Mikroskopische Technik.* — München 1948.

- ROSENBERG, A.: zit. nach JACOP 1904.
- RUPPERT, H.: Experimentelle Untersuchungen über Kohlenstaubinhalation. — Virchows Arch. f. path. Anat. 1878:72:14.
- SCHMALTZ: Die therapeutische Verwendung der intratrachealen Injection bei Thieren. — Deutsche med. Wchnschr. 1888:14:379.
- SCHMIDTMANN, M., & ANGER, R.: Ueber Resorbierbarkeit des Joduron B bei Bronchographie; Ergebnisse experimenteller Untersuchungen. — Virchows Arch. f. path. Anat. 1954:325:353.
- SCHMIDTMANN, M., & DICK, H.: Führt die Bronchographie mit Joduron B zu Lungenschädigungen? — Virchows Arch. f. path. Anat. 1952:322:633.
- SCHOTTELIIUS, M.: Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung inhalierter Substanzen. — Virchows Arch. f. path. Anat. 1878:73:524.
- SEHRWALD, E.: Ueber die percutane Injektion von Flüssigkeiten in die Trachea, deren Verbreitung in der Lunge und Wirkung auf Lunge und Gesamtorganismus. — Deutsches Arch. f. Klin. Med. 1886:39:162.
- SICARD, J. A., & FORESTIER, J.: Methode General d'Exploration Radiologique par l'Huile Iodée (Lipiodol). — Bull. et mém. Soc. méd. d. hop. de Paris 1923:46:463.
- SLAVJANSKY, K.: Experimentelle Beiträge zur Pneumoconiosislehre. — Virchows Arch. f. path. Anat. 1869:48:326.
- SOMMERBRODT, J.: Hat das in die Luftwege ergossene Blut ätiologische Bedeutung für die Lungengeschwindigkeit? — Virchows Arch. f. path. Anat. 1872:55:165.
- DE SOUZA, C.: Nouvelle Technique pour les Injections Intratracheales — Gaz. clin. Sao Paulo 1905:3:497.
- SPRINGER: zit. nach BEUTEL 1935.
- STEWART, On the Treatment of Bronchiectasis. — Brit. M. J. 1893: June 3.:1147.
- STORRS, R. P., McDONALD, J. R., & GOOD, C. A.: Lipoid Granuloma of the Lung following Bronchography with Iodized Oil. — J. Thoracic. Surg. 1949:18:561.
- THOMAS:GLEITSMANN'IN mukaan 1905.
- THORPE, V. G.: Intracheal Injections. — Brit. M. J. 1896: March 7.:545.
- TRAUBE: Ueber das Eindringen feiner Kohlentelchen in das innere des Respirationsapparatus. — Deutsche Klin. 1866:3:69.
- WASBUTZKY, I.: Ueber die Resorption durch die Lungen. — Königsberg 1879.
- WATSON, E. C.: Intratracheal Medication. — Queen's M. Quart. 1905—6:10:66.
- WEBER, H. W., & LÖHR, B.: Ueber klinische Befunde und anatomische Veränderungen der Lungen und Bronchographie mit Per-Abrodil BR (viskös 60 %). — Fortschr. d. Röntgenstr. 1953:79:168.
- WEINBERG, J. A.: Iodized Oil in Bronchiectasis Including Study of 2 Cases Following Lobectomy. — Arch. Surg. 1933:27:545.
- WERLE, E.: Über die Unschädlichkeit der als Quellmittel bekannten celluloseglykolsauren Natriums bei der Verfütterung an Ratten und Hunde. — Chemiker-Zeitung 1941:65:320.
- WERTHEMAN, A.: Lungenschädigungen durch Bronchographien mit Joduron B auf Grund unserer altempirischen und experimentellen Untersuchungen. — Radiologia Clinica 1953:22:511.



- WERTHEMANN, A., & VISCHER, W.: Zur Frage der Lungenveränderungen nach Bronchographien mit carboxymethylcellulosehaltigen Kontrastmitteln. — Schweiz. med. Wchnschr. 1951:44:1077.
- VISCHER, W.: Veränderungen des Lungengewebes nach Bronchographien mit Joduron B. — Schweiz. med. Wchnschr. 1951:3:54.
- ZOLLINGER, H. U.: Schädigt die Joduron-Bronchographie das Lungenparenchym? — Schweiz. med. Wchnschr. 1951:9:210.
- ZOLLINGER, H. U., & FISCHER, F. K.: Weitere empirische und experimentelle Untersuchungen über die Joduron-Bronchographie. — Schweiz. med. Wchnschr. 1953:28:645.

## ABBILDUNGEN



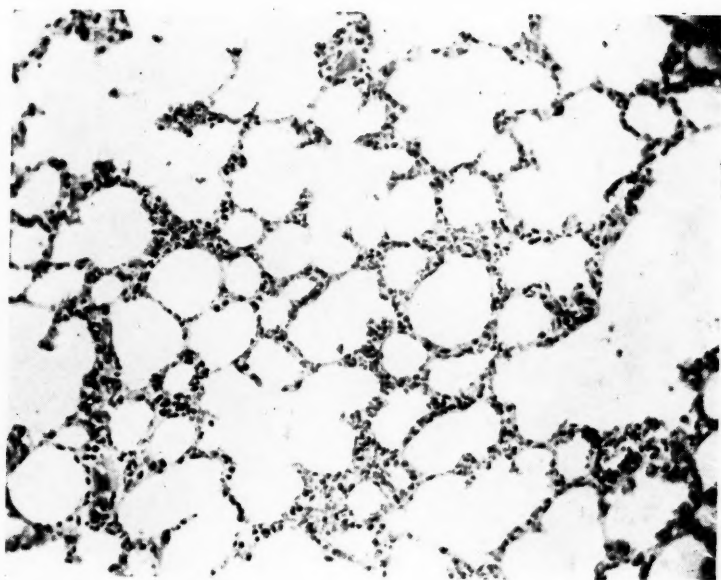


Abb.: 1. — Kontrollserie I., a) — Nebengruppe. Normale, intakte Rattenlunge.  
Haematoxylin-Eosin. Vergr.: 155  $\times$ .

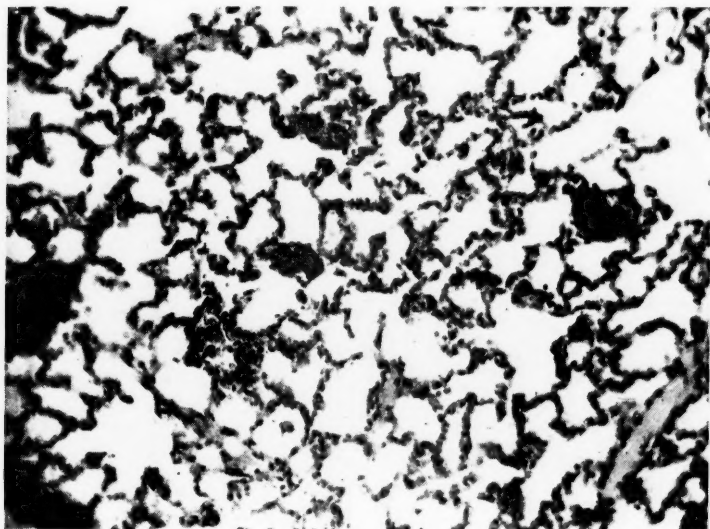


Abb.: 2. — Kontrollserie II b). I Tag nach Inj. — Hyperämie des Lungengewebes  
Haematoxylin-Eosin. Vergr.: 155  $\times$ .

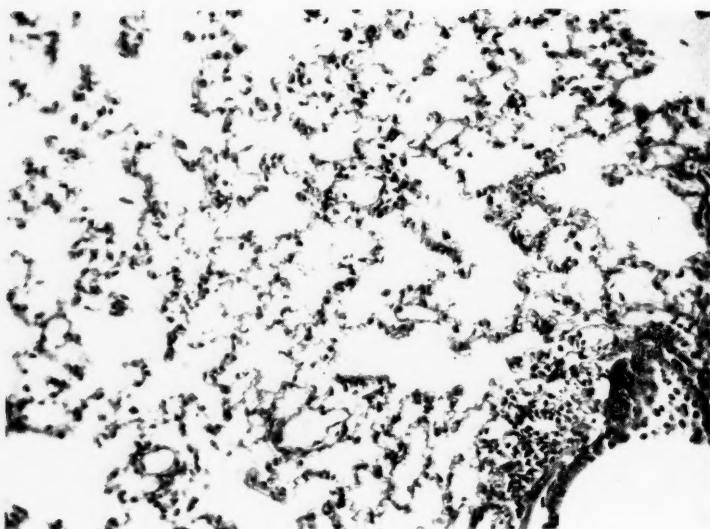


Abb.: 3. — CMC-Serie I a). 1 Tag nach Inj. — Kein Inhalt in den Bronchiolen oder Alveolen nach Perjodat-Leukofuchsinfärbung. Vergr.: 155  $\times$ .

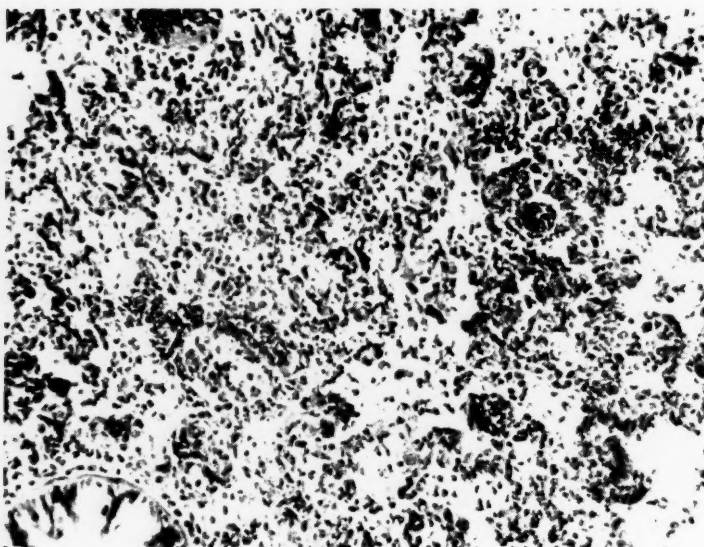
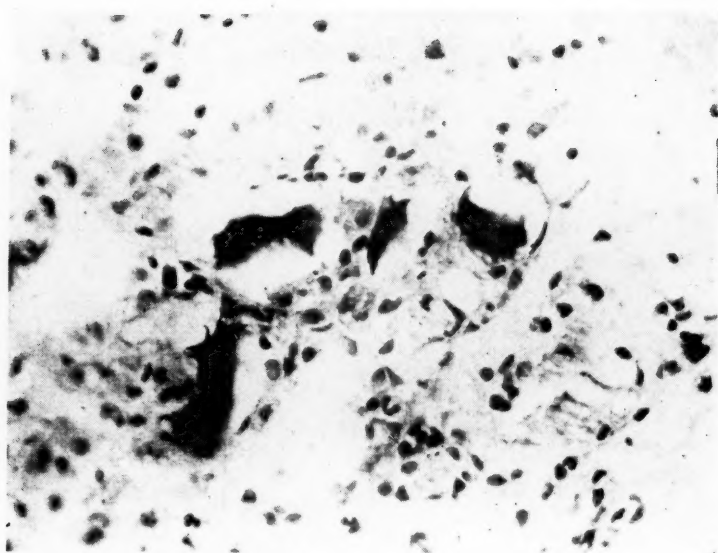
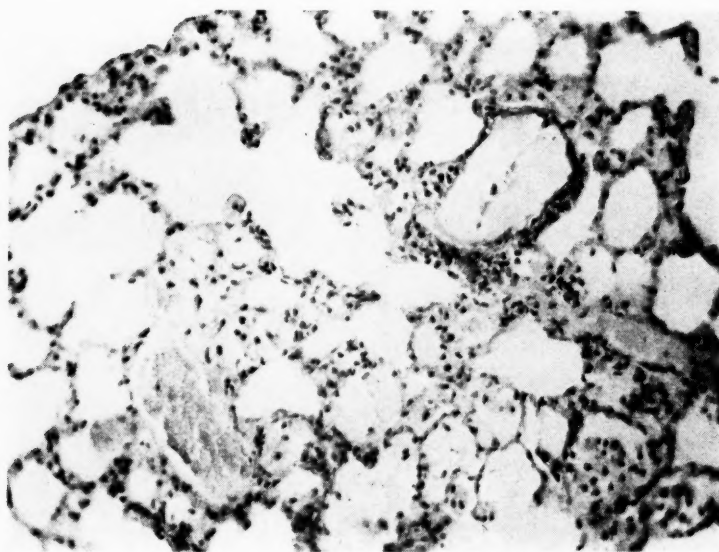


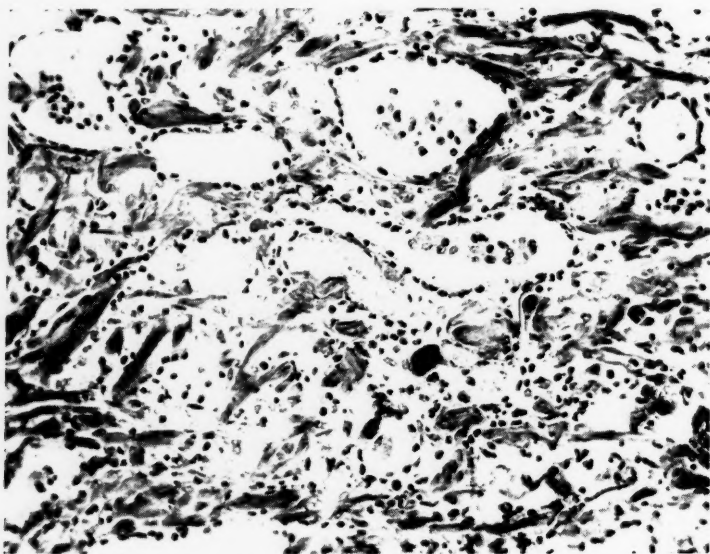
Abb.: 4. — CMC-Serie I a). 2 Tage nach Inj. — Makrophagenreaktion. Haematoxylin-Eosin. Vergr.: 155  $\times$ .



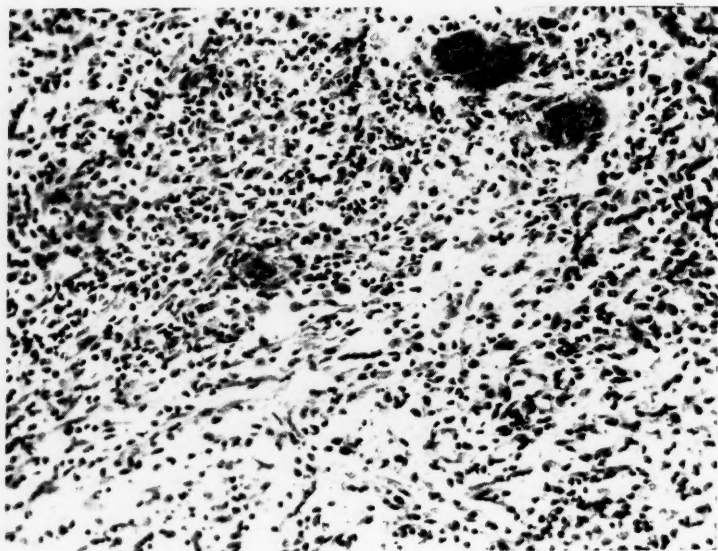
*Abb.: 5.* — CMC-Serie I a). 2 Tage nach Inj. — Alveoleninhalt bei stärkerer Vergrößerung. Toluidinblaufärbung. Vergr.: 340  $\times$ .



*Abb.: 6.* — CMC-Serie I a). Alveoleninhalt 10 Tage nach Inj. Haematoxylin-Eosin. Vergr.: 155  $\times$ .



*Abb.: 7.* — CMC-Serie I a). 50 Tage nach Inj. — Vermehrung des kollagenen Bindegewebes. Haematoxylin (Weigert) — v. Gieson. Vergr.: 155  $\times$ .



*Abb.: 8.* — Derselbe Fall wie in *Abb.: 7.* Granulombildung. Haematoxylin-Eosin. Vergr.: 155  $\times$ .



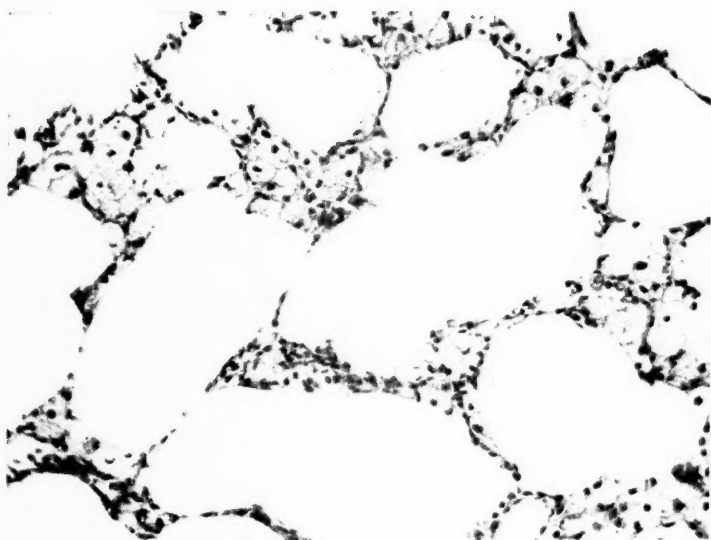


Abb.: 9. — CMC-Serie I a). 5 Monate nach Inj. — Septumständige Makrophagen in den Alveolen. Haematoxylin-Eosin. Vergr.: 155  $\times$ .

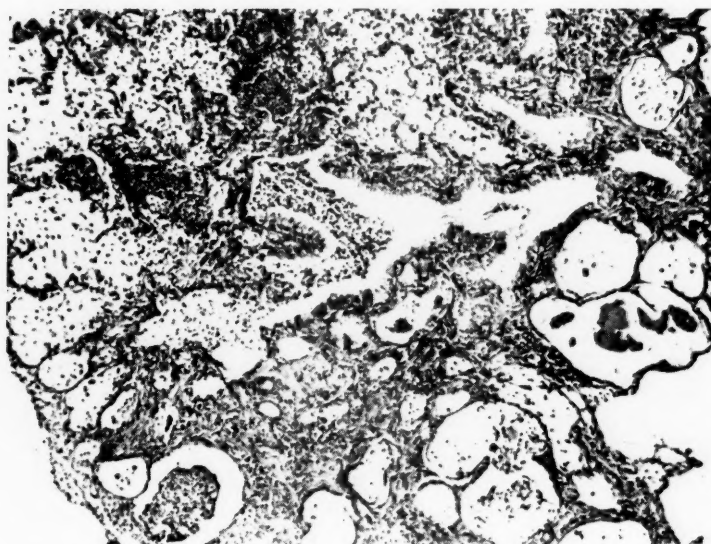
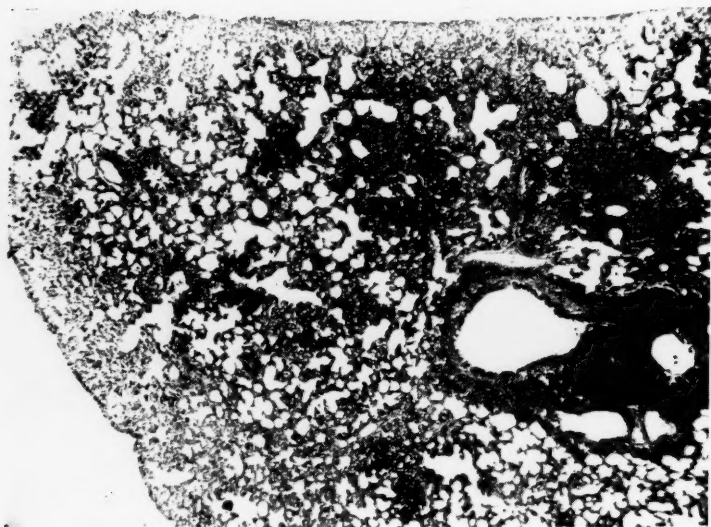


Abb.: 10. — CMC-Serie I a). 1 Jahr nach Inj. — Aussergewöhnlich weite Bronchien und Bronchiolen; peribronchitische Veränderungen. Vermehrung des Bindegewebes. Haematoxylin-Eosin. Vergr.: 60  $\times$ .



*Abb.: 11.* — CMC-Serie II a). Das Vorkommen von gefüllten Alveolen 1 Tag nach Inj. — Toluidinblaufärbung. Vergr.: 40  $\times$ .



*Abb.: 12.* — CMC-Serie II a). Das Vorkommen von gefüllten Alveolen 5 Tage nach Inj. — Toluidinblaufärbung. Vergr.: 40  $\times$ .

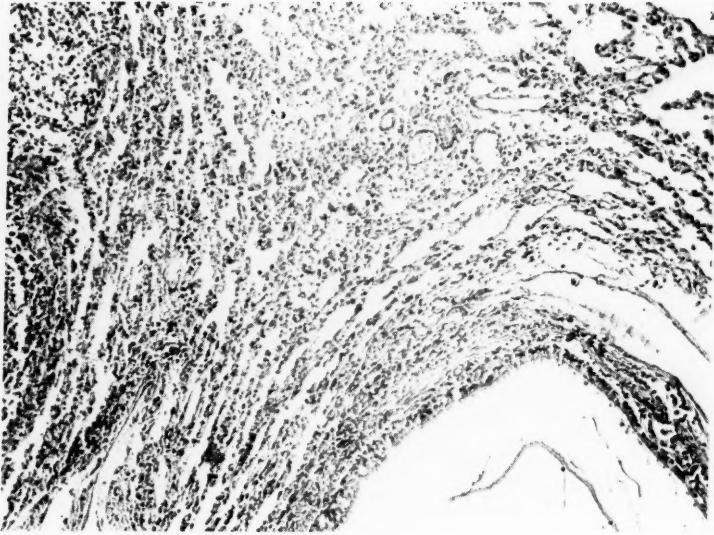


Abb.: 13. — CMC-Serie II a), 10 Tage nach Inj. — Atektatisches Lungengewebe.  
Haematoxylin-Eosin. Vergr.: 70  $\times$ .

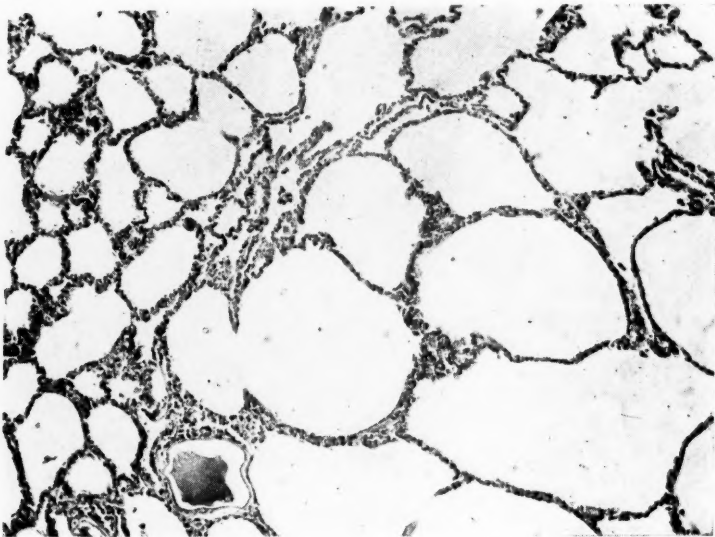
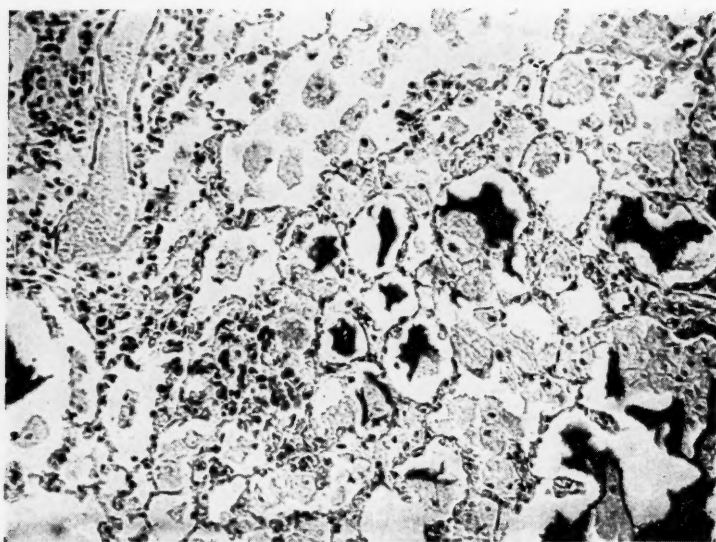
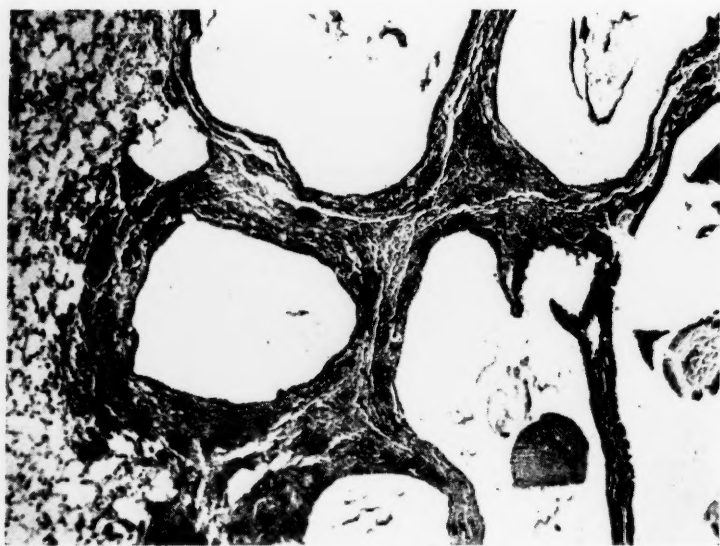


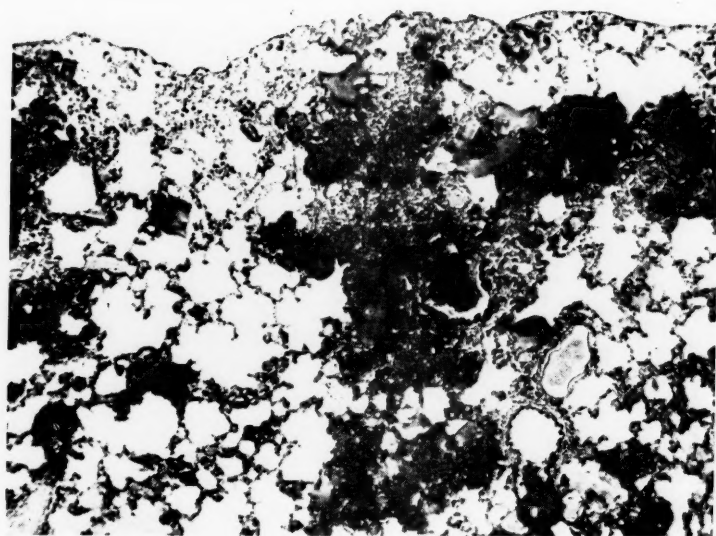
Abb.: 14. — CMC-Serie II a), 10 Tage nach Inj. — Emphysematisches Lungenge-  
webe. Haematoxylin-Eosin. Vergr.: 70  $\times$ .



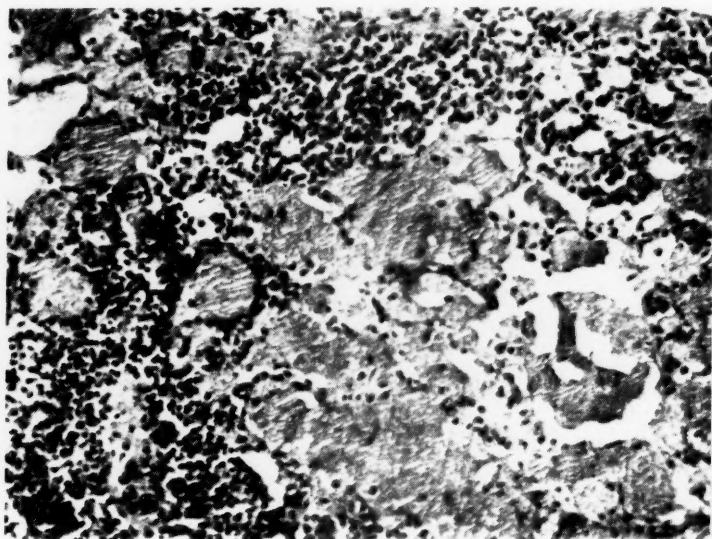
*Abb.: 15.* — CMC-Serie II a). Alveoleninhalt 30 Tage nach Inj. — Toluidinblaufärbung. Vergr.: 240  $\times$ .



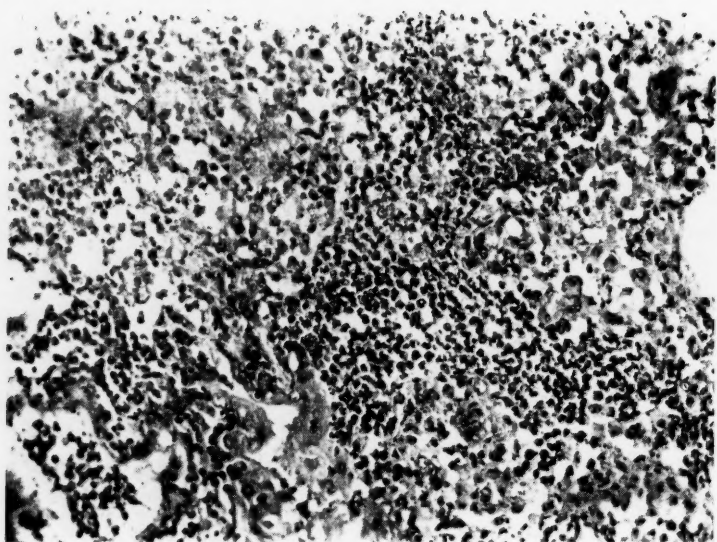
*Abb.: 16.* — CMC-Serie II a). 50 Tage nach Inj. — Erweiterte Bronchien mit intaktem Epithel, Toluidinblaufärbung. Vergr.: 70  $\times$ .



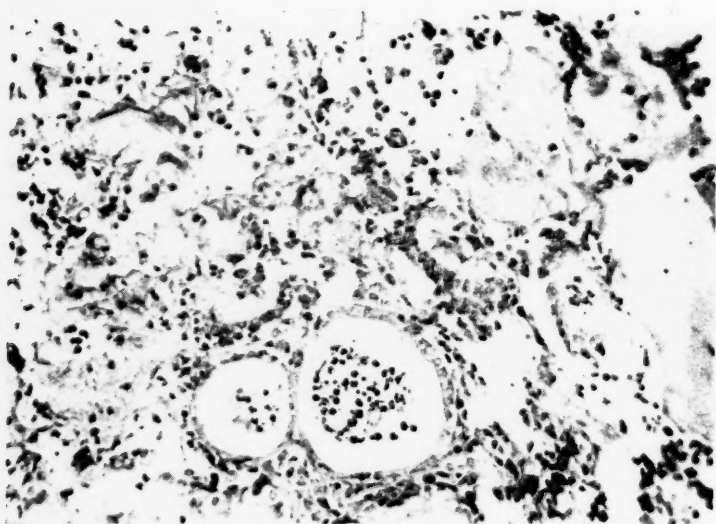
*Abb.: 17.* — CMC-Serie II a). Das Vorkommen von mit CMC und Makrophagen gefüllten Alveolen 70 Tage nach Inj. — Toluidinblaufärbung. Vergr.: 35  $\times$ .



*Abb.: 18.* — CMC-Serie II a). Alveoleninhalt bei stärkerer Vergrößerung 5 Monate nach Inj. — Haematoxylin-Eosin. Vergr.: 240  $\times$ .



*Abb.: 19.* — CMC-Serie II a). 8 Monate nach Inj. — Reichlich zerfallende Makrophagen enthaltende Alveolen und peribronchitische Veränderungen. Haematoxylin-Eosin. Vergr.: 240  $\times$ .



*Abb.: 20.* — CMC-Serie II a). 1 Jahr nach Inj. — In den Alveolen CMC und Makrophagen; ausserdem Zeichen von Peribronchitis. Haematoxylin-Eosin. Vergr.: 240  $\times$ .



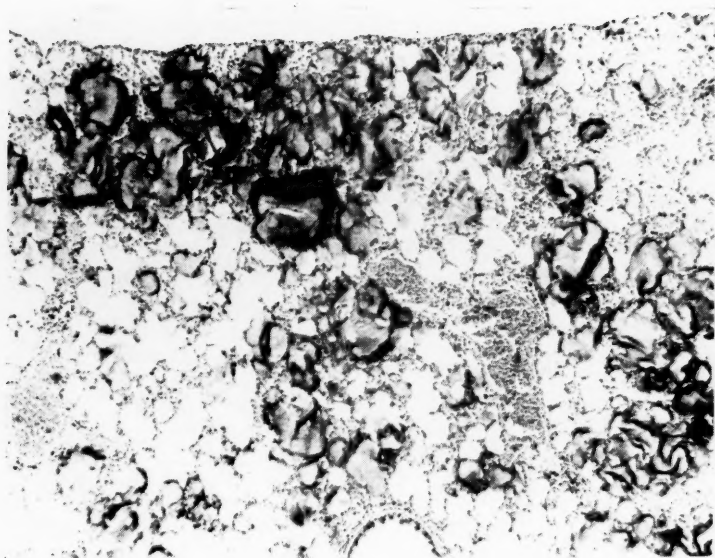


Abb.: 21. — CMC-Serie II b). 10 Tage nach Inj. — Durch Zerreißen der Septen zusammengeflossene, mit CMC gefüllte Alveolen. Toluidinblaufärbung. Vergr.: 35  $\times$ .

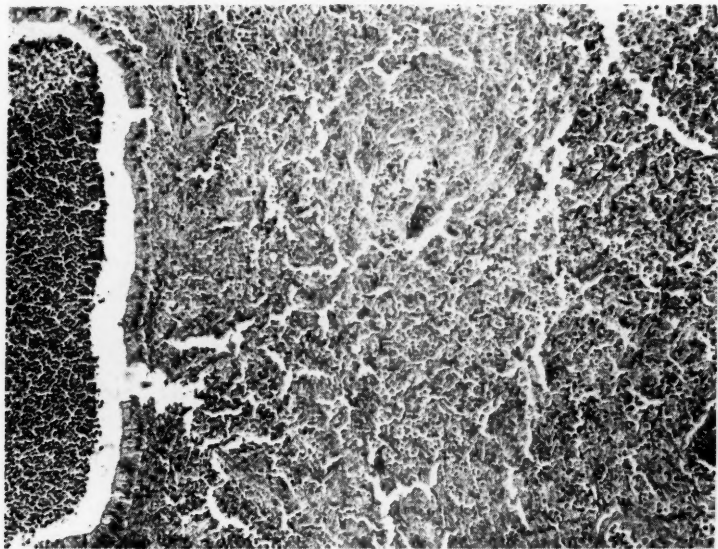
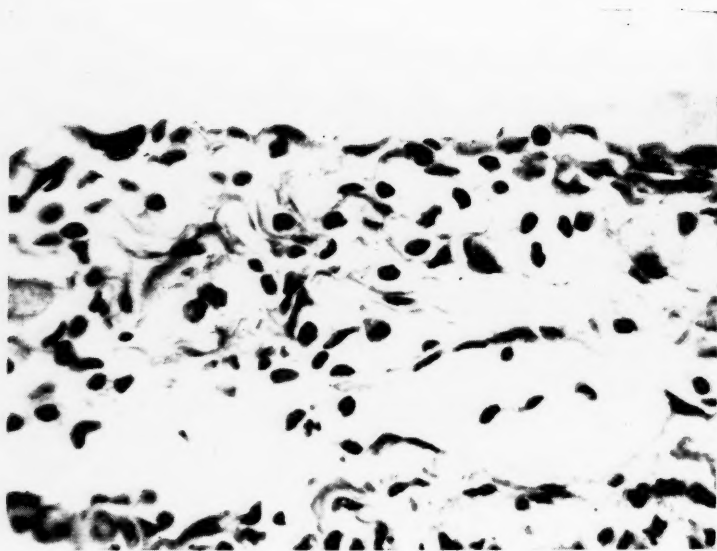
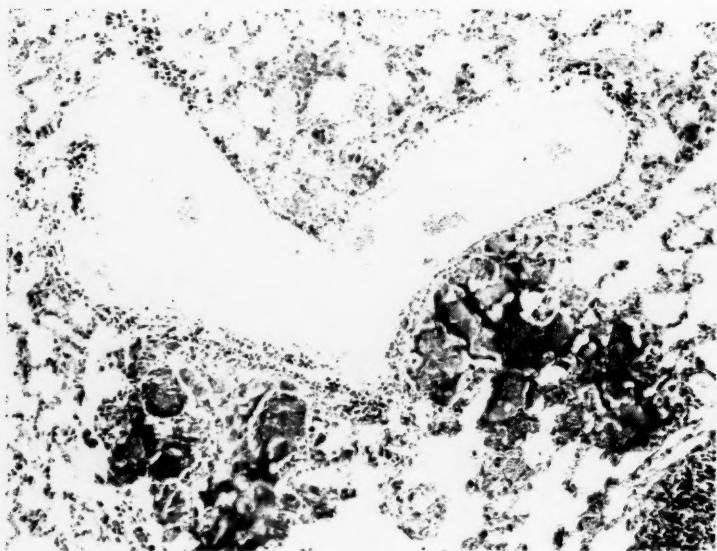


Abb.: 22. — CMC-Serie II b). Starke peribronchitische Veränderungen 10 Tage nach Inj. — Haematoxylin-Eosin. Vergr. 70  $\times$ .





*Abb.: 23.* — Derselbe Fall wie in *Abb.: 22*. Reaktive Veränderungen der Pleura. Ausserdem mit Endothel bekleidete Hohlräume. Haematoxylin (Weigert) — v. Gieson. Vergr.: 450  $\times$ .



*Abb.: 24.* — CMC-Serie II b). 50 Tage nach Inj. — Sowohl mit Makrophagen als auch mit CMC gefüllte Alveolargruppen. Toluidinblaufärbung. Vergr.: 70  $\times$ .

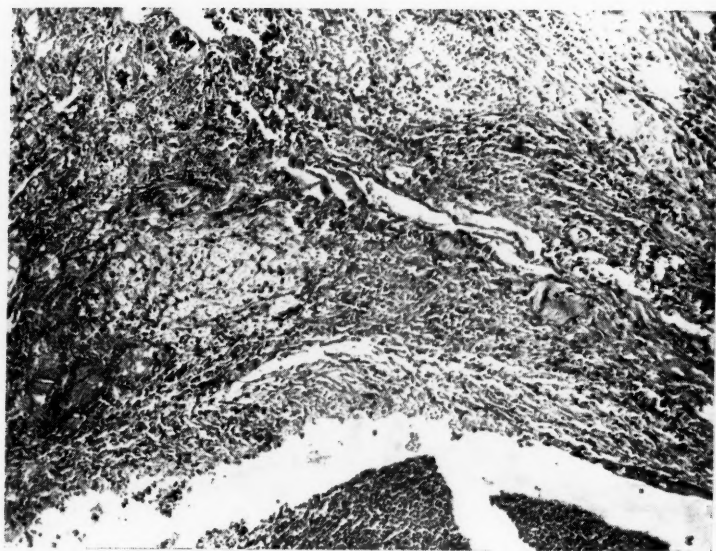


Abb.: 25. — CMC-Serie II b). 5 Monate nach Inj. — Aussergewöhnlich weiter Bronchus, teilweise ohne Epithel. Das umgebende Lungengewebe komprimiert. Haematoxylin-Eosin. Vergr.: 70,  $\times$ .

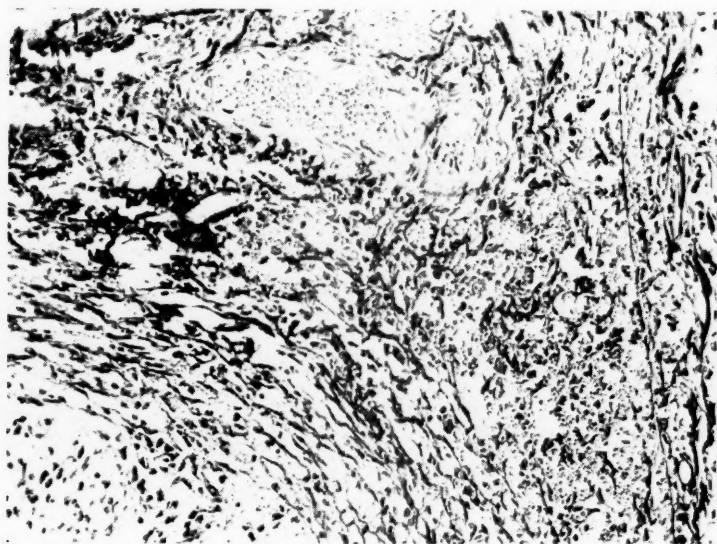


Abb.: 26. — Derselbe Fall wie in Abb.: 25. Vermehrung und Homogenisierung des kollagenen Bindegewebes. Haematoxylin(Weigert) — v. Gieson, Vergr. 155  $\times$ .

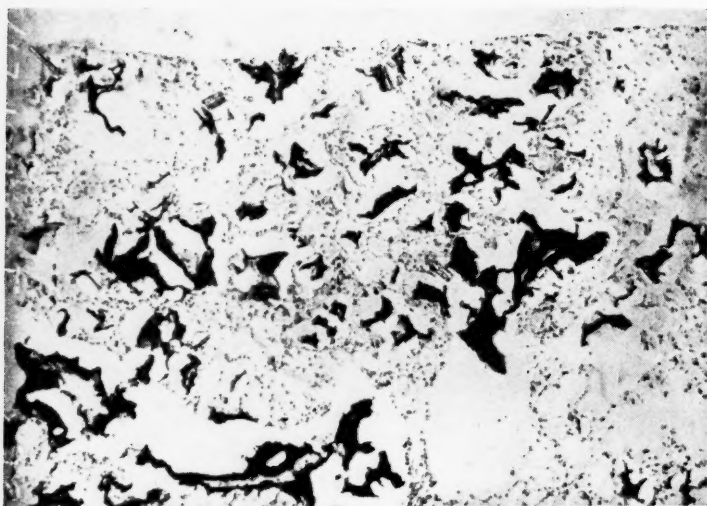


Abb.: 27. — CMC-Serie III a). Das Vorkommen der CMC in den Bronchiolen und Alveolen 20 Tage nach Inj. — Toluidinblaufärbung. Vergr.: 70  $\times$ .

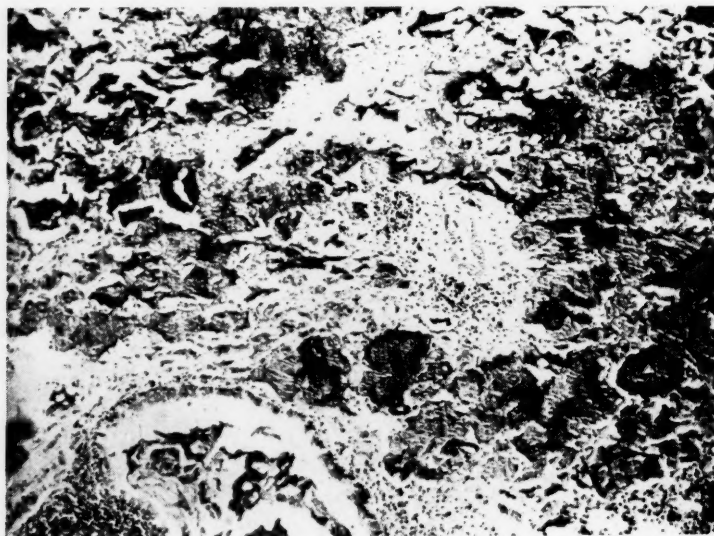
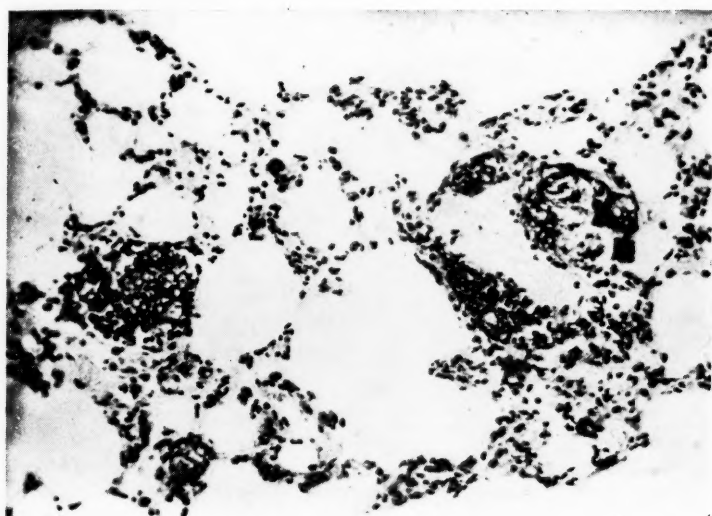
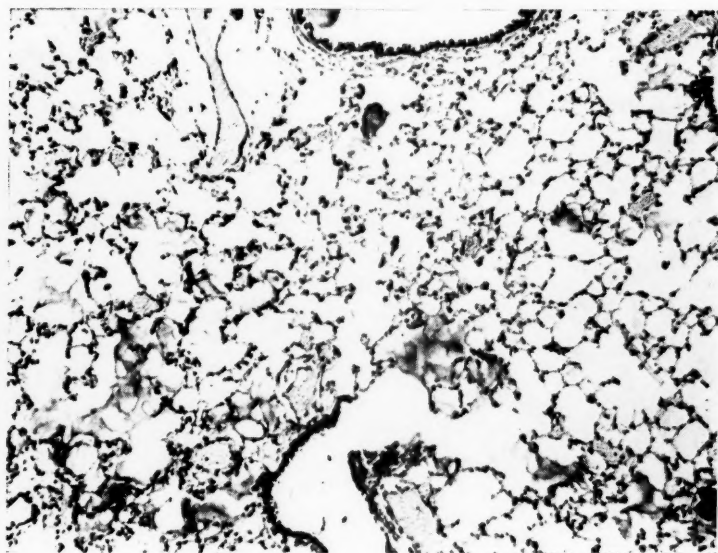


Abb.: 28. — CMC-Serie III a). 5 Monate nach Inj. — Peribronchitische Veränderungen in einem Gebiet, dessen Bronchus, Bronchiolen und Alveolen reichlich CMC und Makrophagen enthielten. Toluidinblaufärbung. Vergr.: 70  $\times$ .



*Abb.: 29.* — CMC-Serie III a). 1 Jahr nach Inj. — Hier und da in den Alveolen ein CMC-Tropfen und ein im Zerfall befindlicher Makrophag. Toluidinblaufärbung, Vergr.: 165  $\times$ .



*Abb.: 30.* — CMC-Serie III b). Alveoleninhalt 1 Tag nach Inj. — Toluidinblaufärbung, Vergr.: 70  $\times$ .

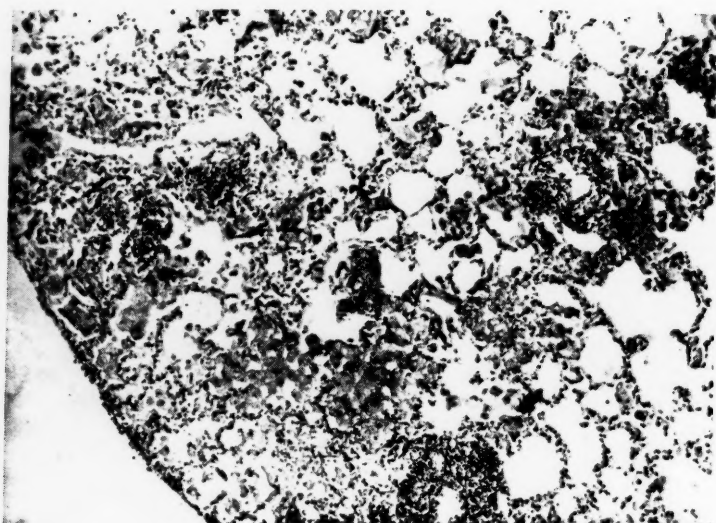


Abb.: 31. — CMC-Serie III b). Die Menge des Alveoleninhaltes 50 Tage nach Inj. — Toluidinblaufärbung. Vergr.: 70  $\times$ .

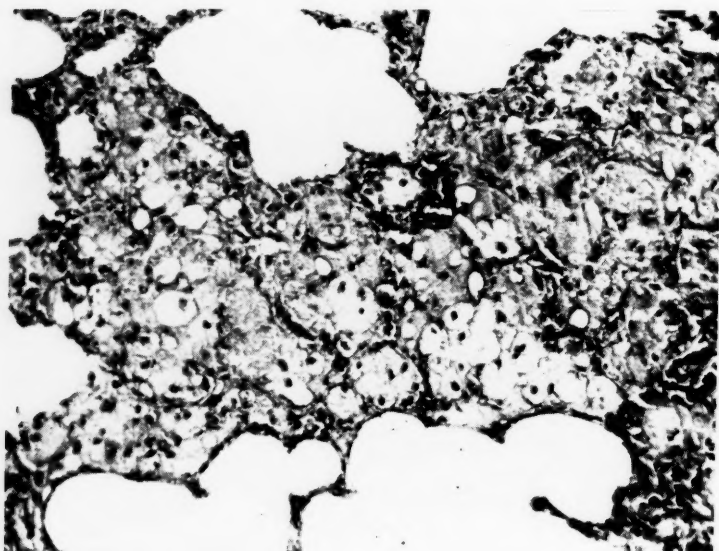


Abb.: 32. — CMC-Serie III b). 8 Monate nach Inj. — Alveolengruppe mit CMC und Makrophagen ausgefüllt. Toluidinblaufärbung. Vergr.: 155  $\times$ .

STUDIES IN ANTIBIOSIS  
BETWEEN THE GENERA ESCHERICHIA  
AND MICROCOCCUS

M. E. Parmala